

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 010**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07732861 .5**

96 Fecha de presentación: **21.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2021471**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2009**

54 Título: **Método de cribado**

30 Prioridad:

26.05.2006 GB 0610542

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

04.01.2013

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

04.01.2013

73 Titular/es:

**MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)
2nd Floor, David Phillips Building, Polaris House,
North Star Avenue
Swindon, SN2 1FL, GB**

72 Inventor/es:

**BIENZ, MARIANN y
RANDOW, FELIX**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 394 010 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

Método de cribado

Campo de la Invención

5 La invención se refiere a la ruta de señalización de Wnt y a los trastornos asociados a defectos en esa ruta. En particular, la invención se refiere a la señalización de poliposis adenomatosa coli (APC) y a la mejora o reducción de los efectores de la misma en el tratamiento de trastornos tales como el cáncer colorrectal.

Antecedentes de la Invención

10 Se ha demostrado que la señalización de Wnt es importante en el cáncer. De hecho, la señalización de Wnt está implicada en la promoción de tumores y el cáncer por medio de defectos genéticos en numerosos niveles o etapas de la ruta. Este tema es revisado con detalle por Polakis (2000 Genes and Development, vol. 14, páginas 1837-1851).

15 La poliposis adenomatosa coli (APC) tiene un papel primordial en la ruta de señalización de Wnt. APC es un supresor tumoral importante cuya función se pierde en la mayoría de los cánceres colorrectales esporádicos y hereditarios. Su función más conocida es la inhibición de β -catenina, un efector clave de la ruta de señalización de Wnt. Además, las proteínas APC parecen tener también una función diferente en el mantenimiento de la adhesión celular mediada por cadherina, y la pérdida de esta función podría acelerar la transición de los tumores hasta una neoplasia maligna invasiva.

20 APC está inactivado en más del 80% de todos los cánceres colorrectales. El gen APC es defectuoso en la poliposis adenomatosa familiar (FAP), una enfermedad heredada de manera dominante que predispone a los tumores colorrectales. La inactivación de APC se observa también en la mayoría de tumores esporádicos, y es un suceso temprano, y posiblemente iniciador, en la tumorigénesis.

25 APC es un regulador negativo de la ruta de señalización de Wnt. Se une y favorece la inhibición de β -catenina, un efector clave de esta ruta. En las células en las que esta ruta es inactiva, la β -catenina se degrada rápidamente, como resultado de la fosforilación en su extremo N-terminal proporcionada por el complejo de destrucción Axin que también contiene glucógeno sintasa quinasa 3β . En la señalización de Wnt, la β -catenina se estabiliza y se transloca al núcleo donde se une a los factores TCF/LEF para activar la transcripción de los genes objetivo de Wnt. Se cree que estos cambios en la transcripción son la base de la tumorigénesis. Así, es un problema controlar la transcripción de los genes objetivo de Wnt, o atenuar su expresión.

30 Las pruebas actuales sugieren que APC, como β -catenina, pueden tener además una función diferente en la adhesión celular. Estas pruebas surgieron del trabajo en *Drosophila*, en la que el pariente de APC, E-APC, está asociado a las uniones adherentes en los epitelios, y parece afectar a la adhesión celular. Están surgiendo pruebas de que esto también es aplicable a las células humanas: el supresor tumoral APC se asocia con las membranas adhesivas laterales en diversas células polarizadas de mamíferos, y se ha implicado en el intercambio de β -catenina en las uniones adherentes y en la adhesión celular de las células de cáncer colorrectal. Estos hallazgos son potencialmente relevantes con respecto a la progresión tumoral, ya que la pérdida de la adhesión mediada por cadherina acompaña a menudo a la transición de los tumores benignos hasta carcinomas invasivos. Así, es un problema estimular o mantener la adhesión celular, tal como la adhesión mediada por cadherina.

40 El dominio más conservado de las proteínas APC es su Dominio de Repeticiones de Armadillo (ARD) N-terminal, un supuesto dominio de interacción con proteínas. Los parientes más cercanos de este dominio se hallan en β -catenina y α -importina; las funciones y estructuras de estos ARDs se conocen bien, lo que incluye las interacciones moleculares precisas con muchos de sus ligandos funcionalmente relevantes. En contraste, es un problema en la técnica que exista un entendimiento escaso de la función molecular del ARD de las proteínas APC, y aunque ha habido informes de ligandos supuestos, su importancia funcional con respecto a APC todavía está poco clara o se desconoce.

45 La presente invención busca superar el/los problema(s) asociado(s) con la técnica anterior.

Sumario de la Invención

50 Los presentes inventores han descubierto una proteína nueva que interacciona de una manera biológicamente significativa con la proteína APC. Se ha aislado esta proteína basándose en su capacidad de interactuar con la proteína de tipo natural, pero no con una proteína APC mutante de repeticiones del ARD. La proteína identificada es Travid. La proteína Travid no tiene ninguna función biológica descrita en la técnica anterior. Así, se ha atribuido un papel de señalización completamente nuevo y biológicamente importante a esta proteína en el presente trabajo.

Además, Travid se ha caracterizado bioquímicamente. Se ha identificado que Travid es una nueva enzima desubiquitilasa. El dominio de unión de ubiquitina se ha definido y se ha demostrado experimentalmente. Travid tiene especificidad de unión por la ubiquitina unida por K63, que se ha definido y se ha demostrado

5 experimentalmente. Esta actividad es necesaria para la actividad de la ruta de Wnt en el cáncer colorrectal o en las células estimuladas por Wnt. La actividad desubiquitilasa se ha definido y se ha demostrado experimentalmente. Además, los efectos de la manipulación de Trabid (en particular la inhibición y/o reducción) y el uso de inhibidores de Trabid se ha demostrado que abarcan la modulación de efectores de Wnt biológicamente importantes en líneas de células humanas con señalización de Wnt activada, así como en líneas de células colorrectales. Así, se ha establecido por primera vez una relación funcional entre Trabid y la señalización de Wnt/transcripción mediada por TCF.

La invención se basa en estos hallazgos notables.

10 La invención proporciona un método para reducir la transcripción de TCF, y dicho método comprende reducir la actividad de Trabid. Preferiblemente, la actividad de Trabid se reduce mediante el uso de siARN hacia Trabid o mediante el uso de Trabid negativo dominante. Cuando se usa Trabid negativo dominante, se introduce en el sistema en el que se desea reducir la actividad de Trabid, por ejemplo mediante el suministro del polipéptido Trabid negativo dominante, o mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica el mismo (es decir, mediante la introducción de dicho ácido nucleico en dicho sistema mediante cualquier medio conocido en la técnica).

15 Preferiblemente, dicha expresión de TCF no es una transcripción estimulada por la fusión β -catenina-Lef. Preferiblemente, dicha transcripción de TCF es una transcripción de TCF estimulada por Dvl, estimulada por Wnt3A, estimulada por LiCl, o estimulada por m β -TrCp- Δ F. Preferiblemente, dicha transcripción de TCF es una transcripción de TCF estimulada por Dvl. Preferiblemente, dicha actividad de TCF es una actividad de TCF estimulada por la mutación de APC o por la pérdida y/o por la activación de beta-catenina. Estas aplicaciones específicas se demuestran en la sección de ejemplos, p.ej. con referencia a la línea de células de cáncer SW480 mutantes para APC, y la línea de células de cáncer HCT116 mutantes para beta-catenina (como se muestra en las figuras), las cuales dependen de la actividad de Trabid.

20

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de inhibición de la transcripción de TCF que comprende la inhibición o regulación a la baja de Trabid.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de la poliposis adenomatosa familiar en un sujeto, que comprende modular la señalización de Trabid en dicho sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento del cáncer colorrectal en un sujeto, que comprende modular la señalización de Trabid en dicho sujeto. Las referencias al cáncer colorrectal incluyen de manera adecuada el cáncer de colon.

30 Preferiblemente, la modulación de Trabid es la inhibición de Trabid.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de Trabid en la desubiquitilación, preferiblemente el uso de Trabid para eliminar un resto de ubiquitina de un polipéptido, preferiblemente el uso de Trabid en la desubiquitilación de un polipéptido.

35 La desubiquitilación significa la eliminación de una o más unidades de ubiquitina de un polipéptido que comprende las mismas. Dependiendo de dónde tiene lugar la escisión para la eliminación, las unidades liberadas pueden corresponder a unidades de ubiquitina completas, cadenas de poliubiquitina, o fragmentos de ubiquitina. Preferiblemente, se liberan unidades de ubiquitina completas. Preferiblemente, la desubiquitilación significa la eliminación completa de la ubiquitina de un polipéptido, y preferiblemente significa la eliminación de todo(s) el/los grupo(s) de ubiquitina de dicho polipéptido.

40 Preferiblemente, la desubiquitilación comprende la escisión de la ubiquitina unida por K63. Preferiblemente, Trabid comprende al menos el dominio de tumor ovárico (OTU) C-terminal. Preferiblemente, Trabid comprende los motivos de dedos de zinc NZF N-terminales. (Los motivos de dedos de zinc se clasifican en varios tipos diferentes. Trabid tiene dedos de tipo NZF, que se conocen también como 'dedos de tipo RanBP', y como 'dedos ZnF_RBZ' - los términos se usan de manera intercambiable en la presente memoria).

45 Preferiblemente, Trabid comprende el polipéptido Trabid humano de longitud completa.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un inhibidor de Trabid para la fabricación de un medicamento para el cáncer colorrectal.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un inhibidor de Trabid para la fabricación de un medicamento para la poliposis adenomatosa familiar.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un inhibidor de Trabid para el uso en el tratamiento del cáncer colorrectal.

En otro aspecto, la invención proporciona un inhibidor de Trabid para el uso en el tratamiento de la poliposis adenomatosa familiar.

Preferiblemente, dicho inhibidor de Trabid es siARN hacia Trabid, o es un Trabid negativo dominante tal como Trabid C443S. De manera adecuada, el inhibidor de Trabid puede ser un inhibidor de la actividad desubiquitinasa tal como

ubiquitina-aldehído. De manera adecuada, el inhibidor de Trabid puede ser un inhibidor de la actividad de unión de ubiquitina unida por K63.

5 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de Trabid en la precipitación de un polipéptido que comprende ubiquitina, tal como ubiquitina unida a K63. Este es un reactivo útil, por ejemplo, en la inmunoprecipitación, o en la preparación de APC inmovilizado (u otros componentes) en virtud de su capacidad de unirse a Trabid.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un método para la identificación de un modulador de Trabid, y dicho método comprende; proporcionar un sustrato de Trabid que comprende un resto detectable acoplado a un resto marcador mediante ubiquitina; inmovilizar la primera y segunda porciones de dicho sustrato; añadir un modulador candidato a la primera porción; poner en contacto dicha primera y segunda porciones con Trabid; incubar para permitir la acción de Trabid, y ensayar la escisión de la ubiquitina mediante la separación del marcador del resto detectable, en la que la separación de una cantidad de resto detectable de dicha primera porción que es diferente de la cantidad de resto detectable separada de dicha segunda porción identifica a dicho candidato como un modulador de Trabid.

15 Trabid significa el polipéptido Trabid o el ácido nucleico que codifica el mismo. Preferiblemente, Trabid se refiere al polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Trabid comprende el dominio activo de desubiquitilasa de Trabid. Esto se describe con más detalle más adelante.

20 Se describe por primera vez que Trabid tiene actividad desubiquitilasa, y está implicado en la señalización de Wnt. Así, en un aspecto amplio, la invención se refiere a un método para la identificación de moduladores de la señalización de Wnt, y dicho método comprende ensayar la actividad desubiquitilasa de Trabid en presencia y ausencia de un modulador candidato, en el que una diferencia de actividad desubiquitilasa entre la presencia y ausencia del modulador candidato lo identifica como un modulador de la señalización de Wnt. En otro aspecto, la invención proporciona un método para la identificación de moduladores de Trabid, y dicho método comprende ensayar la actividad desubiquitilasa de Trabid en presencia y ausencia de un modulador candidato, en el que una diferencia de actividad desubiquitilasa entre la presencia y ausencia del modulador candidato lo identifica como un modulador de Trabid. Preferiblemente, dichos moduladores candidatos son inhibidores candidatos, y una reducción de la actividad de Trabid en presencia de dicho inhibidor candidato lo identifica como un inhibidor de la señalización de Wnt y/o de Trabid.

El modulador candidato puede ser cualquier entidad tal como una entidad química, una macromolécula biológica u otra sustancia similar.

30 Preferiblemente, dicho método de identificación de un modulador comprende además la etapa de fabricar una cantidad eficaz de dicho modulador.

Preferiblemente, dicho método de identificación de un modulador comprende además la etapa de formular dicho modulador para la administración a un sujeto.

35 Preferiblemente, dicho método de identificación de un modulador comprende además la etapa de fabricar un medicamento que comprende dicho modulador.

40 Preferiblemente, la separación del marcador del resto detectable se determina ensayando la liberación del resto detectable al sobrenadante. De esta manera, el sobrenadante posee de forma ventajosa la señal de lectura. En otra realización, preferiblemente, la separación del marcador del resto detectable se determina ensayando la retención del resto detectable en el material inmovilizado. De esta manera, el recipiente inmovilizado lavado se puede examinar para obtener la lectura.

Preferiblemente, dicha primera y segunda porciones de dicho sustrato se inmovilizan por medio del resto marcador.

45 El resto marcador y el resto detectable pueden ser cada uno un 'marcador', si se desea. El punto clave, preferiblemente, es que se puedan distinguir. Esta característica significará en general que el resto marcador y el resto detectable son diferentes, ya que si fueran iguales sería difícil posiblemente realizar la lectura o controlar el ensayo. Si el resto marcador y el resto detectable son iguales, la lectura del ensayo se basará en la separación del sobrenadante del recipiente de ensayo para su manipulación por separado, lo que puede añadir trabajo al funcionamiento del ensayo.

50 Preferiblemente, el resto marcador y el resto detectable son diferentes. En esta realización, el resto marcador puede ser de manera ventajosa cualquiera adecuado para la inmovilización (y por lo tanto no es necesario que sea detectable), lo que potencialmente proporciona una elección más amplia y/o una reducción del coste de los materiales de ensayo.

Preferiblemente, la cantidad de Trabid en cada tratamiento es la misma.

Preferiblemente, la separación de una cantidad inferior de resto detectable de dicha primera porción en comparación con dicha segunda porción identifica a dicho modulador candidato como un inhibidor de Trabid. La liberación de una

cantidad inferior sería debida a una actividad de Trabid inferior, por lo que se demostraría que la inhibición ha tenido lugar.

5 En otra realización, preferiblemente, la separación de una cantidad superior de resto detectable de dicha primera porción en comparación con dicha segunda porción identifica a dicho modulador candidato como un activador de Trabid. Si el modulador candidato activa Trabid durante un tiempo de reacción dado (tiempo de incubación), entonces se habrá digerido una cantidad mayor de sustrato, proporcionando una lectura mayor.

Preferiblemente, dicho sustrato de Trabid comprende una proteína de fusión GST-ubiquitina-ubiquitina-S, en la que dicho resto detectable comprende S, y en la que dicho resto marcador comprende GST.

10 Preferiblemente, dichas primera y segunda porciones de sustrato se inmovilizan en pocillos diferentes de una placa de microtitulación. Esta es de manera ventajosa una plataforma idónea para un cribado de alto rendimiento.

Preferiblemente, la inmovilización es mediante la unión a un anticuerpo anti-GST que se ha revestido previamente en la superficie interna de los pocillos de una placa de microtitulación.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para la modulación del dominio de repeticiones de armadillo (ARD) de APC, y dicho método comprende poner en contacto dicho APC con Trabid. Preferiblemente, dicha modulación es mediante un impedimento estérico provocado por la unión de Trabid, p.ej. el bloqueo de la unión de otra proteína al dominio ARD.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un método para la identificación de un Trabid mutante que se une a un APC mutante, y dicho método comprende proporcionar un polipéptido Trabid mutante candidato; poner en contacto dicho polipéptido Trabid mutante candidato con dicho polipéptido APC mutante y monitorizar la asociación entre dicho polipéptido Trabid mutante candidato y dicho polipéptido APC mutante, en el que la asociación entre dichos polipéptidos indica que el polipéptido Trabid mutante candidato se une a dicho APC mutante. Preferiblemente, dicho APC mutante es APC N507K, o E-APC N175K.

25 En un aspecto amplio, la invención se refiere a un polipéptido APC en el que dicho polipéptido comprende una mutación N175 o N507. En una realización, preferiblemente, dicho APC es APC humano y dicha mutación comprende una mutación N507, preferiblemente dicha mutación N507 es N507K. En otra realización, preferiblemente, dicho APC es E-APC y dicha mutación comprende una mutación N175, preferiblemente dicha mutación N175 es N175K. Preferiblemente, el polipéptido APC como se describió anteriormente exhibe una capacidad reducida de unirse a Trabid respecto del polipéptido APC de tipo natural. Preferiblemente, la invención se refiere a los usos de este polipéptido APC en la modulación de la señalización de Wnt.

30 El polipéptido Trabid mutante candidato puede ser una biblioteca de múltiples polipéptidos Trabid mutantes candidatos. Preferiblemente, dicha biblioteca es una biblioteca de expresión que produce dichos polipéptidos Trabid mutantes candidatos a partir de ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) los mismos.

35 En otro aspecto, la invención proporciona Trabid o un fragmento del mismo en el que dicho Trabid comprende una mutación C443. Preferiblemente, dicho Trabid es Trabid humano que comprende la secuencia de aminoácidos de número de acceso CAB64449, en el que dicha mutación C443 es C443S. En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un Trabid o fragmento del mismo como se describió anteriormente.

En otro aspecto, la invención proporciona Trabid para el uso como un medicamento.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de Trabid para la fabricación de un medicamento para el cáncer colorrectal.

40 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de Trabid para la fabricación de un medicamento para la poliposis adenomatosa familiar.

En otro aspecto, la invención proporciona Trabid para el uso en el tratamiento del cáncer colorrectal.

En otro aspecto, la invención proporciona Trabid para el uso en el tratamiento de la poliposis adenomatosa familiar.

45 En otro aspecto, la invención proporciona Trabid para el uso en el mantenimiento de los compartimentos de células madre y/o la estimulación de la actividad de las células madre.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de Trabid recombinante o purificado como una E3 ubiquitina ligasa.

Descripción Detallada de la Invención

50 La invención se refiere al estudio y a la mejora del entendimiento de las funciones de las proteínas que interactúan con el dominio ARD de APC, tales como Trabid, y al examen de sus papeles supuestos como reguladores o efectores de APC, y/o sus efectos sobre la señalización de Wnt y la adhesión celular. La invención permite así un mejor entendimiento del supresor tumoral APC y su función no solamente en la señalización de Wnt, sino también en

la adhesión celular. Además, la invención posibilita la identificación de moléculas y mecanismos que atenúan o bloquean la actividad de señalización de Wnt en las células de cáncer colorrectal.

Trabid

5 Trabid pertenece a una familia pequeña de proteínas de dominios OTU (tumor ovárico) de mamíferos que contiene también A20 y Cezanne. El dominio OTU tiene una signatura de cisteína proteasa clásica, y se ha demostrado que A20 y Cezanne exhiben actividad desubiquitilante (DUB). A20 es un regulador negativo de la señalización de NFκB y la inflamación, y Cezanne también es capaz de inhibir la transcripción mediada por NFκB. La función de Trabid se describe en la presente memoria por primera vez.

10 De manera importante, se demuestra que la pérdida de la función de Trabid reduce la actividad de la ruta de Wnt, de manera que según la presente invención cualquier reducción o inhibición de Trabid (p.ej. de su actividad de desubiquitilación) es beneficiosa para el tratamiento del cáncer colorrectal y/u otros trastornos o enfermedades relacionadas con Wnt.

15 Se debería indicar que la actividad de la ruta de Wnt es necesaria para el mantenimiento de los compartimentos de las células madre (p.ej. en el intestino, y en otras células tales como el sistema hematopoyético). Así, los agonistas de la ruta de Wnt (tales como Trabid o los activadores/inductores de Trabid) pueden tener aplicación en la estimulación de la actividad de las células madre. Evidentemente, se debería tener cuidado al poner en práctica esta realización de la invención para equilibrar los efectos beneficiosos de sobreactivar la ruta respecto de los efectos oncogénicos negativos.

20 Dos características distintivas de Trabid son una sustitución D>A conservada en el sitio activo supuesto de su dominio OTU, y múltiples dedos de zinc en su extremo N-terminal que no se hallan ni en A20 ni en Cezanne. Estos dedos de zinc son del tipo NZF, y son los motivos de unión a ubiquitina. En particular, *Drosophila* contiene solamente un miembro de esta familia de proteínas OTU, que exhibe ambas de estas características, y es así un ortólogo de Trabid de mamíferos. Además, se debería indicar que hay varios tipos estructuralmente diferentes de dominios de unión de ubiquitina - el dominio de tipo dedo de zinc solamente se ha descrito recientemente. Estos dominios existen en un amplio intervalo de proteínas, y existen en proteínas para las que no se ha demostrado una actividad ubiquitinasa o desubiquitilasa.

25 Es digno de atención que se ha demostrado que Trabid tiene actividad DUB, porque posee una sustitución D>A en su tríada catalítica predicha. Esta sustitución es poco habitual, y se podría haber tomado como una indicación de que Trabid no poseyera actividad desubiquitilasa. Sin embargo, se demuestra que esta sustitución es compatible con la actividad DUB. Sin desear limitarse por la teoría, puede conducir de manera ventajosa a una forma específica del sitio activo que sería sensible selectivamente a inhibidores que pueden no afectar a los sitios activos de otros dominios OTU, lo que posibilita una selectividad/especificidad mayor en los inhibidores según la presente invención.

30 También se describe una actividad de Trabid adicional: la actividad E3 ubiquitina ligasa. Las pruebas de esto se muestran en el ejemplo 12 (obsérvese la beta-catenina menos ubiquitilada y la proteína total menos ubiquitilada tras la reducción de Trabid). Así, se demuestra por primera vez que Trabid tiene actividad E3 ubiquitina ligasa, y que la inhibición de esta actividad es relevante para la reducción de la actividad de la ruta de Wnt. Esta actividad de Trabid está mediada probablemente por su región de dedos de zinc NZF, probablemente por medio de motivos de unión de ubiquitina que actúan como mediadores o que contribuyen a la actividad E3 ubiquitina ligasa. Es interesante indicar que el pariente de Trabid A20 tiene tanto actividad DUB como actividad E3 ubiquitina ligasa, y ambas son importantes para su función. Así, la invención se refiere al uso de Trabid recombinante o purificado como una E3 ubiquitina ligasa. La invención se refiere además a la manipulación de la señalización de Wnt mediante la manipulación de la actividad E3 ubiquitina ligasa de Trabid, y preferiblemente la invención se refiere a la reducción de la señalización de Wnt mediante la reducción de la actividad E3 ubiquitina ligasa de Trabid.

35 La secuencia de Trabid de *Drosophila* (dTrabid) se puede hallar con el número de acceso NP_649931 (o AAF54429). El término 'Trabid' se refiere a la proteína o a un homólogo de la misma. Preferiblemente, el Trabid de la invención es Trabid de mamífero, preferiblemente Trabid de ratón (número de acceso CAD67576 (o NP_997185), lo más preferiblemente Trabid humano (número de acceso CAB64449 (o NP_060050)). Las referencias a Trabid en la presente memoria se refieren preferiblemente a la secuencia humana, preferiblemente la secuencia de aminoácidos humana, a menos que se indique de otra manera por el contexto. La secuencia humana es la más relevante clínicamente para los aspectos terapéuticos de la invención, tales como poliposis adenomatosa familiar (FAP), cáncer colorrectal y los aspectos relacionados. Lo mismo es aplicable a las secuencias de nucleótidos para Trabid mencionadas en la presente memoria. Las secuencias de nucleótidos públicamente disponibles de Trabid se pueden identificar mediante el uso de los números de acceso para las secuencias de aminoácidos proporcionados anteriormente.

50 Trabid incluye los fragmentos de Trabid. Los fragmentos pueden ser de cualquier tamaño, y pueden incluir delecciones tales como del extremo C-terminal o el extremo N-terminal o una o más delecciones internas o una combinación de delecciones. Trabid puede incluir además mutantes tales como sustituciones de aminoácidos, por ejemplo la mutación C443S. Trabid puede incluir además mutantes tales como mutantes por adición, por ejemplo un

marcador epitópico u otro marcador, un marcador de histidinas, un marcador de GST u otro resto similar para ayudar en la purificación, o se puede añadir otra secuencia deseada a la secuencia de Trabid de interés.

Es importante que las variantes de Trabid tales como los mutantes por delección y/o los mutantes por sustitución y/o adición o las combinaciones de los mismos conserven la función biológica relevante de interés. Por ejemplo, cuando se estudia o se ensaya la unión de Trabid a ubiquitina, es importante que los motivos de dedos de zinc estén presentes. Igualmente, cuando se estudia la actividad desubiquitilasa de Trabid, es importante que se conserve la tríada catalítica. Evidentemente, cuando las funciones se estudian por separado, será aceptable separar las partes de la molécula de Trabid que proporcionan las diferentes funciones. Por ejemplo, el dominio N-terminal de Trabid está implicado en la unión de ubiquitina, mientras el dominio C-terminal está implicado en la actividad desubiquitilasa. Naturalmente, la molécula de Trabid funciona como una unidad en su entorno biológico, y así, preferiblemente, se usa Trabid completo (longitud completa) en los métodos y técnicas descritas en la presente memoria. Se debe indicar también que aunque es importante que los polipéptidos Trabid mantengan su función para ser considerados fragmentos de Trabid, hay realizaciones de la invención en las que la función se puede eliminar o comprometer de manera deliberada mediante mutación. Un ejemplo de tal mutante de Trabid es un Trabid C443S. C443 es un aminoácido de la tríada catalítica. Así, el mutante C443S es un Trabid catalíticamente inactivo útil en la presente invención. Así, en un aspecto, la invención se refiere a Trabid o un fragmento del mismo en el que dicho Trabid o fragmento comprende una mutación C443, preferiblemente la mutación C443S.

Los fragmentos de Trabid también pueden tener aplicación en la presente invención. Preferiblemente, los fragmentos tienen una longitud de al menos 10 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 20 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 30 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 50 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 100 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 150 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 200 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 250 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 300 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 350 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 400 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 450 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 500 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 550 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 600 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 650 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 700 aminoácidos contiguos, preferiblemente una longitud de al menos 707 aminoácidos contiguos, lo más preferiblemente la longitud completa con respecto a Trabid de tipo natural humano.

Un Trabid preferido de la invención es un fragmento de Trabid que comprende los aa 355-708. Esto tiene una aplicación particular en la determinación de la actividad desubiquitilasa de Trabid. Un Trabid preferido de la invención es un fragmento de Trabid que comprende los aa 1-354. Esto tiene una aplicación particular en la determinación de la unión de ubiquitina.

Para ser considerado un polipéptido Trabid, el polipéptido de interés debe ser un homólogo de Trabid humano como se discutió anteriormente. A este respecto, preferiblemente el Trabid muestra identidad de secuencia respecto de Trabid humano - preferiblemente, el Trabid (o fragmento del mismo) exhibe al menos un 30% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 40% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 45% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 50% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 55% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 60% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 65% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 70% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 75% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 80% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 85% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 90% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 95% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 98% de identidad respecto de Trabid humano, preferiblemente al menos un 99% de identidad respecto de Trabid humano, o incluso más. Esto mismo es aplicable a las secuencias de nucleótidos que codifican Trabid, en las que se tiene que tener en cuenta la variación por la degeneración del código genético. La identidad se juzga preferiblemente a lo largo de la longitud del Trabid (o fragmento del mismo) de interés.

Cuando se estudia o se ensaya la actividad desubiquitilasa de Trabid, es importante usar un polipéptido Trabid que comprende el dominio catalítico de desubiquitilasa de Trabid. Este dominio catalítico está asociado al dominio de tumor ovárico (dominio OTU) de Trabid. El dominio catalítico es preferiblemente el extremo C-terminal de Trabid, preferiblemente los aminoácidos 355-708 de Trabid de ratón o humano. Preferiblemente, se usa el polipéptido Trabid hTrabCT 355-708.

Preferiblemente, Trabid es Trabid recombinante o purificado. Preferiblemente, Trabid es Trabid recombinante.

Trabid se prepara preferiblemente por medios recombinantes. En general, el polipéptido Trabid de interés se expresa a partir de una secuencia de nucleótidos adecuada portada en un plásmido en E. coli, y el polipéptido resultante se purifica a partir de ello mediante el uso de procedimientos habituales conocidos para un experto en la técnica.

'Modular la actividad de Trabid' tiene su significado normal en la técnica, es decir, manipular la actividad de Trabid aumentándola o reduciéndola. Esto se puede llevar a cabo manipulando la actividad de Trabid propiamente dicha, p.ej. mediante el uso de inhibidores, construcciones de Trabid negativas dominantes u otros medios adecuados, o se puede llevar a cabo manipulando los niveles de Trabid, por ejemplo elevando o reduciendo su expresión (p.ej. a nivel transcripcional o traduccional), aumentando o reduciendo su degradación, captura u otros medios de eliminación o pérdida de Trabid. Preferiblemente, la modulación significa inhibición. Preferiblemente, la inhibición de la actividad de Trabid se lleva a cabo mediante el uso de un inhibidor, un Trabid negativo dominante o mediante la reducción de los niveles de Trabid. Preferiblemente, la inhibición o reducción de la actividad de Trabid se lleva a cabo mediante el uso de siARN hacia Trabid para reducir su expresión, o mediante el uso de Trabid negativo dominante para reducir la actividad de Trabid, tal como la actividad de señalización.

Es importante indicar que la invención también se refiere a los inhibidores de Trabid y a su uso en contrarrestar o generar efectos opuestos a Trabid. Por ejemplo, se puede usar Trabid para inducir o mantener o elevar la transcripción de TCF/LEF, así un inhibidor de Trabid se puede usar para eliminar, inhibir o reducir la transcripción de TCF/LDF; se puede usar Trabid en la desubiquitilación de proteínas, así un inhibidor de Trabid se puede usar en la inhibición de la desubiquitilación o en el mantenimiento de la ubiquitina en las proteínas; esto mismo es aplicable a las otras aplicaciones de Trabid descritas en la presente memoria y a los efectos opuestos que se pueden generar de manera ventajosa mediante el uso de un inhibidor de Trabid.

Inhibidor de Trabid significa un inhibidor de la función de Trabid. Esto puede ser de manera ventajosa una molécula diferente a la molécula de Trabid, por ejemplo una que se une a Trabid para generar la inhibición. De manera alternativa, un inhibidor de Trabid puede ser una entidad que reduce los niveles de Trabid, por ejemplo un siARN que reduce la expresión de Trabid. De manera alternativa, un inhibidor de Trabid puede ser un Trabid negativo dominante, tal como el Trabid C443S catalíticamente inactivo descrito en la presente memoria, o fragmento(s) de Trabid inhibitorio(s). El Trabid negativo dominante puede ser el Trabid N-terminal, tal como Trabid aa 1-350, o puede ser el Trabid C-terminal, tal como Trabid 351-708, o puede ser un mutante de Trabid catalíticamente inactivo tal como un mutante de Trabid C443, p.ej. Trabid C443S, o un fragmento del mismo. Preferiblemente, el Trabid negativo dominante comprende el Trabid catalíticamente inactivo o un fragmento del mismo, preferiblemente Trabid 351-708 C443S.

Preferiblemente, un inhibidor de Trabid es siARN hacia Trabid, o Trabid negativo dominante tal como Trabid C443S.

Ubiquitina

Numerosos procesos de señalización celular están catalizados o controlados por la modificación postraduccional de proteínas mediante la adición o eliminación de ubiquitina. La ubiquitina es una proteína conservada de 76 residuos de aminoácidos. Esta unidad de ubiquitina fundamental se puede polimerizar en cadenas de poliubiquitina. Los bloques de ubiquitina individuales en estas cadenas están conectados mediante enlaces isopeptídicos que unen un residuo de lisina específico de una ubiquitina y el grupo carboxilo del residuo G76 de la siguiente ubiquitina. Existen al menos dos modos para este enlace isopeptídico - los tipos K48 y K63. Las cadenas de poliubiquitina construidas con enlaces K48 tienden a señalar la degradación proteosómica de la proteína a la que están unidos. Las cadenas construidas por medio de enlaces K63 señalan en general resultados no proteolíticos. Además, la estructura química y la longitud de las cadenas también pueden influir en los sucesos de señalización. Preferiblemente, las cadenas de poliubiquitina de la presente invención son cadenas K63.

La química de ubiquitina *in vitro* se ha caracterizado bien en la técnica. Por ejemplo, Pickart y Raasi (2005 *Methods in Enzymology*, Volumen 399, páginas 21-36) describen la síntesis controlada de cadenas de poliubiquitina con gran detalle.

Los grupos de ubiquitina se eliminan mediante enzimas desubiquitinilantes (tales como desubiquitilasa, enzima desubiquitinilante o 'DUB'). Para estudiar la acción de las enzimas desubiquitinilantes, se usa ubiquitina que contiene sustratos que dan lugar a productos visualizables tras la acción de desubiquitilación. Se describen varios derivados de ubiquitina fluorescentes útiles como sustratos muy sensibles para estas enzimas en Tirat *et al* (2005 *Analytical Biochemistry*, Volumen 343, páginas 244-255).

En la familia de enzimas desubiquitinilantes hay varios subgrupos. Las otubaínas son una familia de enzimas desubiquitinilantes recientemente identificadas que pertenecen a la superfamilia de proteínas de tumor ovárico (OTU). Nanao *et al* (2004 *EMBO Volumen 5*, páginas 783-788) describe la estructura cristalina de la otubaína humana. Se describe el sitio activo, y se propone un modelo para la unión otubaína-ubiquitina. Se puede hallar una revisión de la familia de otubaínas de enzimas desubiquitinilantes en Balakirev *et al* (2003 *EMBO*, Volumen 4, páginas 517-522). Se presentan detalles del sitio de escisión usado por estas proteasas (exactamente en la unión ubiquitina - polipéptido) y se describen peptidasas nuevas que pertenecen a esta familia. En estas publicaciones se describen diversos reactivos, tales como anticuerpos antiubiquitina y similares.

Ubiquitina unida por K63

- Los inventores han observado la especificidad de unión de Travid por las cadenas de ubiquitina unidas por K63. Además, esta especificidad de unión está mediada por los dedos de Zn de Travid. En otras palabras, se describe que Travid tiene especificidad de unión por la ubiquitina unida por K63 por medio de su(s) dedo(s) de zinc. La selectividad por K63 es notable. Esto posibilita usos y aplicaciones adicionales de la invención.
- 5 Así, la invención se refiere a polipéptido(s) que comprende(n) uno o más de los dedos de Zn de Travid, o secuencias de dedos de Zn derivadas de ellos, como reactivos para seleccionar como objetivo restos tales como proteínas unidas a cadenas de ubiquitina unida por K63, y a los usos de los mismos. En particular, la invención tiene aplicación en la ruta NFκB en la que existen ejemplos sólidos de sucesos funcionalmente relevantes de esta naturaleza.
- 10 A modo de ilustración de la utilidad/aplicación industrial de la invención, se debería indicar que las actividades de DUB y/o unión de Ub, en particular la actividad de unión de ubiquitina unida por K63, de Travid es necesaria para su función en células de cáncer colorrectal SW480 o células con estimulación de Wnt (véanse los ejemplos y la Fig. 10D; véase también la Fig. 19).
- Así, la invención proporciona un polipéptido que comprende
- 15 (i) al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Travid aa 4-32, Travid aa 84-112 y Travid aa 149-177, o
- (ii) al menos una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 25% de identidad respecto de una secuencia de aminoácidos de longitud completa de (i), en la que se conservan los residuos del núcleo de los dedos de zinc estructurales de dicha secuencia de aminoácidos de (i);
- 20 en el que dicho polipéptido comprende al menos dos dominios de dedos de zinc, y en el que si dicho polipéptido comprende Travid de tipo natural de longitud completa, dicho polipéptido comprende al menos un aminoácido adicional además de ello.
- En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido como se describió anteriormente, en el que la al menos una secuencia de aminoácidos de (ii) tiene al menos un 33% de identidad respecto de una secuencia de aminoácidos de longitud completa de (i), en el que se conservan los residuos del núcleo de los dedos de zinc estructurales de dicha secuencia de aminoácidos de (i), y en el que se conservan los residuos de unión de ubiquitina en la interfase hidrófoba.
- 25 En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido como se describió anteriormente que se une a ubiquitina unida por K63.
- 30 En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende
- (i) una secuencia de aminoácidos de interés; y
- (ii) un polipéptido como se describió anteriormente.
- En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende
- (i) una secuencia de aminoácidos de interés; y
- 35 (ii) un polipéptido Travid que se une a ubiquitina unida por K63;
- en el que dicho polipéptido Travid de (ii) comprende al menos dos dominios de dedos de zinc
- en el que dichos dominios de dedos de zinc comprenden al menos una secuencia con signatura de dedo de zinc de al menos un dedo de zinc NZF de Travid. En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Travid como se ha definido.
- 40 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un polipéptido como se describió anteriormente o el uso de un polipéptido Travid como se describió anteriormente en la selección como objetivo de un resto de interés unido a ubiquitina unida por K63.
- De manera adecuada, dicho resto de interés es una proteasa.
- De manera adecuada, dicho resto de interés es un marcador.
- 45 En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se describió anteriormente.
- Los polipéptidos Travid selectivos de ubiquitina unida por K63 preferidos comprenden los aminoácidos x a y de Travid, preferiblemente Travid humano, en el que x se selecciona de 1 a 4, e y se selecciona de 177 a 354; de

manera adecuada, x es 1 ó 4 e y es 177, 350 ó 354.

Un polipéptido Travid selectivo de ubiquitina unida por K63 adecuado que se une de manera específica a ubiquitina unida por K63 es Travid NT (extremo N-terminal de Travid) 1-354.

5 Un polipéptido Travid selectivo de ubiquitina unida por K63 más corto adecuado comprende la región que abarca los 3 dedos NZF, concretamente Travid 4-177.

Dedos de Zn de Travid

Los dedos de Zn individuales de Travid son dedos de zinc de tipo NZF.

10 Cada uno de estos se puede unir a mono-ubiquitina con una afinidad modesta (K_d 100-400 μ M, con referencia a Alam et al 2004 (Embo J. vol 23, págs. 1411-1421), ya que cada uno se adapta igualmente bien a la signatura de los NZFs de unión a ubiquitina determinados por Alam et al 2004 (ibíd.), basándose en la estructura del complejo NZF de Npl4-ubiquitina. Por lo tanto, los NZFs de Travid individuales parecen equivalentes o incluso intercambiables para ciertas aplicaciones.

15 Sin embargo, se debe indicar que los NZFs individuales pueden no exhibir especificidad por las cadenas unidas por K63 por sí solas (es decir, como polipéptidos que comprenden solamente un único dedo de Zn), ya que NZF de Npl4 se une a la superficie 'I44' reconocida habitualmente de un monómero de ubiquitina individual. Así, preferiblemente, un polipéptido Travid selectivo de K63 según la presente invención comprende al menos dos ZnFs, tales como los NZFs de Travid.

20 Un 'NZF de Travid' es una secuencia de aminoácidos que corresponde a o que procede de la secuencia de un dedo de Zn de Travid. Cuando la secuencia de aminoácidos 'procede de' la secuencia de un dedo de Zn de Travid, esto significa que posee un grado de identidad de secuencia de aminoácidos hacia al menos una secuencia de dedos de Zn de Travid, y posee la signatura central de los NZFs de unión a ubiquitina determinada por Alam et al 2004 (ibíd.). Los grados de identidad de secuencia son como se discutió anteriormente, y preferiblemente se refieren a una secuencia que incluye la secuencia de la signatura de NZF central. En estas realizaciones, preferiblemente, la identidad de secuencia se juzga en la secuencia completa que corresponde a el/los NZF(s) de Travid, en general el dominio de ZnF de 28 aminoácidos propiamente dicho.

25 Las localizaciones de los tres dedos de Zn individuales (NZFs) en Travid son: NZF1 4-32, NZF2 84-112, NZF3 149-177.

30 Los dedos de Zn se pueden combinar en un único polipéptido. La combinación de dos NZFs cualesquiera, (lo que incluye la duplicación, p.ej. repetición de dos dedos idénticos) puede unir ubiquitina con una afinidad mayor que un NZF simple, y puede mostrar especificidad.

De manera adecuada, cuando se usan dos dedos, son dedos compuestos por los aminoácidos de Travid 4-112 ó 84-177.

Es probable que la combinación de los 3 NZFs de Travid se una con una afinidad superior a ubiquitina, y muestre una especificidad aumentada por ubiquitina K63.

35 Un número mayor de ZnFs, tal como más de tres ZnFs, puede proporcionar una unión aumentada y/o especificidad aumentada por ubiquitina K63. Preferiblemente, se usan múltiplos de 3 NZFs (p.ej., la duplicación de los aminoácidos de Travid 4-177).

40 Es improbable que el orden de la presencia de NZFs individuales en un único polipéptido según la presente invención afecte de manera significativa a la unión/especificidad. El experto puede optimizar fácilmente dicho orden. Preferiblemente, se conserva el orden que se da de manera natural.

Espaciadores

Es improbable que las secuencias espaciadoras (es decir, las secuencias que se dan entre ZnFs individuales) contribuyan directamente a la unión/especificidad. Preferiblemente, se usan los espaciadores y/o las secuencias espaciadoras naturales de Travid.

45 El espaciador NZF1-NZF2 es de 51 aminoácidos; el espaciador NZF2-NZF3 es de 36 aminoácidos; el espaciador NZF1-NZF3 es de 116 aminoácidos.

50 El espaciamiento concreto puede ser flexible, y puede ser elegido por el operador. Por ejemplo, el espaciamiento varía entre 21-85 aminoácidos (NZF1-NZF2), o 26-113 aminoácidos (NZF2-NZF3) entre diferentes ortólogos de Travid en especies diferentes. A pesar de esto, cada ortólogo de Travid parece tener al menos un intervalo corto de 21-53 aminoácidos (en general entre NZF1 y NZF2), y por lo tanto se prefiere al menos un intervalo corto de 21-53 aminoácidos entre ZnFs. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de espaciamiento tiene una longitud de 21-113 aminoácidos entre ZnFs individuales.

Los residuos del núcleo estructural predicho de los NZFs (basados en la estructura de Npl4; Wang et al 2003, JBC, vol. 278, págs. 20225-20234) comprenden:

W7, C10, C13, N17, C24, C27 (NZF1)

W88, C90, C93, N97, C104, C107 (NZF2)

5 W153, C155, C158, N162, C169, C172 (NZF3)

Las mutaciones puntuales en cualquiera de estos (p.ej. hasta alanina) pueden alterar la estructura del núcleo, y pueden reducir o eliminar la unión de ubiquitina, y/o la especificidad por K63. Así, preferiblemente, los polipéptidos de la presente invención conservan cada uno de estos residuos en la(s) secuencia(s) de ZnF correspondiente(s).

10 Los residuos de unión de ubiquitina predichos en la interfase hidrófoba (basados en el complejo NZF de Npl4-ubiquitina; Alam et al; 2004) comprenden:

(C13) T14, Y15, M26 (C27) (NZF1)

(C93) T94, Y95, Q106 (C107) (NZF2)

(C158) T159, Y160, V171 (C172) (NZF3)

15 La signatura de unión de ubiquitina es 'T, Y/F, alifático' en las posiciones anteriores que flanquean los C2 y C4 de coordinación de zinc; en hTrabid los residuos en estas posiciones (que flanquean el segundo y cuarto C de coordinación de zinc) son T, Y, M (ZnF1) T, Y, Q (ZnF2) y T, Y, V (ZnF3).

Las mutaciones puntuales en cualquiera de estos (p.ej. T L, Y V) pueden reducir o eliminar la unión de ubiquitina (y/o la especificidad por K63), pero no es probable que destruyan la estructura.

20 Así, preferiblemente, los polipéptidos de la presente invención conservan la signatura de unión de ubiquitina en la(s) secuencia(s) de ZnF correspondiente(s); preferiblemente, los polipéptidos de la presente invención conservan cada uno de estos residuos en la(s) secuencia(s) de ZnF correspondiente(s).

Restos de Interés

25 Se pueden unir restos de interés, tales como marcadores y/o secuencias objetivo, al polipéptido de la invención de cualquier manera adecuada. De manera adecuada, se pueden unir mediante la producción recombinante de un polipéptido que incorpora los elementos deseados en el polipéptido de la invención (las denominadas 'proteínas de fusión'). En esta realización, de manera adecuada, la unión es en el extremo C-terminal o en el extremo N-terminal, preferiblemente en el extremo C-terminal.

Selectividad por K63 o Especificidad por K63

30 Se presenta un ensayo para la especificidad por K63 en la sección de ejemplos (en particular con referencia a la Fig. 9A y descrito en los métodos correspondientes).

Se espera que la Kd para las cadenas de ubiquitina unidas por K63 sea mayor que la afinidad por mono-ubiquitina (que se espera que sea ~100-400 μ M para la mono-ubiquitina; véase anteriormente).

Se estima que la preferencia por las cadenas de ubiquitina unidas por K63 frente a las unidas por K48 sea de 10-100x.

35 *Aplicaciones Adicionales*

El reactivo de unión de K63 es útil para dirigir restos hacia la ubiquitina unida por K63, en aplicaciones médicas y/o aplicaciones industriales.

40 Por ejemplo, la invención tiene aplicación en la ejecución de cambios en la homeostasis celular de las cadenas de ubiquitina K63. Para influir en la fisiología celular dependiente de las cadenas K63, se puede emplear la especificidad de unión a K63 para dirigir a una entidad efectora cerca de las cadenas de ubiquitina K63. Las entidades efectoras pueden comprender dominios de proteasas, p.ej. para escindir o degradar cadenas de ubiquitina y/o una proteína sustrato; E3 ubiquitina ligasas para degradar las cadenas de ubiquitina y/o una proteína sustrato; o cualquier otro resto que se desee dirigir hacia las cadenas de ubiquitina K63.

45 Para las realizaciones de etiquetado/maraje, la invención se puede aplicar a la detección de cadenas de ubiquitina K63 en forma libre o unidas a proteínas sustrato, por ejemplo en el estudio de:

- la detección subcelular de cadenas de ubiquitina K63 (y/o proteínas sustrato)
- el enriquecimiento bioquímico de cadenas de ubiquitina K63 (y/o proteínas sustrato)

5 La etiqueta/marcador puede ser cualquier etiqueta o marcador adecuado conocido en la técnica, tal como un marcador epitópico o uno fluorescente o una actividad enzimática o un isótopo o cualquier otro resto detectable adecuado que incluye, por ejemplo, los marcadores químicos (p.ej., la unión covalente de un marcador mediante el uso de un acoplamiento químico habitual); marcadores genéticos (p.ej., proteínas de fusión o productos de corte y empalme de proteínas).

10 Los restos más funcionales incluyen etiquetas o marcadores tales como marcadores de afinidad (por ejemplo, marcadores de anticuerpos simples o múltiples; marcadores de afinidad de proteínas, tales como marcadores en tándem, marcador de estreptavidina); marcadores fluorescentes (p.ej., marcador FIAsH, marcadores fluorescentes habituales tales como FITC o PE, puntos cuánticos, GFP u otras proteínas fluorescentes); marcadores enzimáticos (por ejemplo HRP); marcadores para cambiar la fisiología celular seleccionando como objetivo las proteínas asociadas a cadenas K63 (por ejemplo, una proteasa o una E3 ubiquitina ligasa con la posibilidad de degradar la proteína sustrato de la cadena de ubiquitina K63).

Se pueden realizar mutaciones de las regiones de unión a K63 de Travid. Tales mutantes incluyen la mutación de uno o más de los dedos de Zn, o el mutante C155A u otra mutación que afecta a la actividad de unión a K63.

15 **Wnt/APC**

Las expresiones 'actividad de la ruta de Wnt' y 'actividad de transcripción de TCF' se usan de manera intercambiable en la presente memoria.

20 La investigación en la que se basa la invención implica una mutación de *APC* de *Drosophila* fuerte que interfiere con la señalización de Wnt y con las funciones de adhesión. Esta mutación sin sentido afecta a su dominio más conservado (denominado Dominio de Repeticiones de Armadillo, ARD), un supuesto dominio de interacción con proteínas cuya función en APC se entiende escasamente en la técnica anterior. Se ha identificado una proteína conservada (Travid) cuya función biológica no se conocía previamente. Se describe que esta proteína se une al ARD de tipo natural, pero no al mutante. Travid es una proteína nucleo-citoplasmática con actividad desubiquitilante. Las pruebas demuestran que Travid contribuye a la actividad de señalización de Wnt en las células de cáncer colorrectal.

25 Se describen las funciones de Travid en células de mamífero y en *Drosophila*, y se investiga si actúa como regulador o efector de APC. Se puede(n) examinar el/los papel(es) de Travid en la señalización de Wnt y/o en la adhesión celular, y su importancia funcional se puede ensayar en células de cáncer colorrectal según la presente invención. Esto mejora de manera ventajosa el entendimiento de las funciones moleculares de APC y su importancia en el cáncer colorrectal, y proporciona nuevas vías para el diagnóstico, el tratamiento y/o la prevención de esta enfermedad frecuente.

30 Así, la invención se refiere a la identificación de los objetivos moleculares de Travid en la ruta de señalización de Wnt en diversas líneas celulares humanas, que incluyen células de cáncer colorrectal, examinando la aparición de proteínas candidatas ubiquitiladas como resultado de la reducción de Travid mediante interferencia de ARN.

35 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de aproximaciones de pérdida de la función para ensayar la necesidad de Travid para la expresión de los genes objetivo de Wnt y la proliferación de células de cáncer colorrectal, y al examen de su papel en la señalización de Wnt durante el desarrollo de diversos sistemas de modelos que incluyen *Drosophila* y *Xenopus*.

40 La invención se aplica de manera ventajosa a los genes objetivo de Wnt, en particular los mostrados en la Fig. 10 B, C.

Ensayos

Los ensayos según la presente invención se describen en la presente memoria, en particular en los ejemplos y en las figuras adjuntas.

45 Se pueden hacer fácilmente variantes de los ensayos de la invención, por ejemplo mediante referencia al desarrollo de un ensayo basado en placas de la unión entre β -catenina y BCL9 (véase la Figura 1).

Preferiblemente, los ensayos de la invención son ensayos para la identificación de inhibidores de Travid.

Composiciones Farmacéuticas

50 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Travid o inhibidor(es) de Travid de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (que incluye las combinaciones de los mismos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para el uso humano o animal en medicina humana y veterinaria, y comprenderán en general uno o más de un diluyente, vehículo, o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para el uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica, y se

describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico se puede seleccionar con respecto a la vía de administración deseada y a la práctica farmacéutica habitual. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como - o además de - el vehículo, excipiente o diluyente cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de revestimiento, agente(s) solubilizante(s).

Se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato sódico; ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

Pueden existir diferentes necesidades de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de administración. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular para administrarla mediante el uso de una mini-bomba o mediante una vía mucosa, por ejemplo, como un spray o aerosol nasal para la inhalación o una disolución para ingestión, o de manera parenteral en la que la composición se formula en una forma inyectable, para la administración, por ejemplo, mediante una vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. De manera alternativa, la formulación se puede diseñar para administrarla mediante varias vías.

Cuando el agente se va a administrar de manera mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería poder permanecer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debería ser resistente a la degradación proteolítica, estable al pH ácido y resistente al efecto detergente de la bilis.

Cuando sea adecuado, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante inhalación, en forma de un supositorio u óvulo vaginal, de manera tópica en forma de una loción, disolución, crema, pomada o polvo dispersable, mediante el uso de un parche cutáneo, de manera oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o en mezcla con excipientes, o en forma de elixires, disoluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o se pueden inyectar de manera parenteral, por ejemplo de manera intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones se pueden usar mejor en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones se pueden administrar en forma de comprimidos o pastillas que se pueden formular de una manera convencional.

Para ciertas realizaciones, el Trabid o inhibidor(es) de Trabad de la presente invención se puede usar también en combinación con una ciclodextrina. Se sabe que las ciclodextrinas forman complejos de inclusión y no inclusión con moléculas de fármaco. La formación de un complejo fármaco-ciclodextrina puede modificar las propiedades de solubilidad, velocidad de disolución, biodisponibilidad y/o estabilidad de una molécula de fármaco. Los complejos fármaco-ciclodextrina son útiles en general para la mayoría de formas farmacéuticas y vías de administración. Como alternativa a la complejación directa con el fármaco, la ciclodextrina se puede usar como un aditivo auxiliar, p.ej. como un vehículo, diluyente o solubilizante. Las alfa-, beta- y gammaciclodextrinas se usan de manera muy habitual, y se describen ejemplos adecuados en los documentos WO-A-91/11172, WO-A-94/02518 y WO-A-98/55148.

Cuando se usa Trabad, o cuando el/los inhibidor(es) de Trabad comprende(n) una proteína, dicha proteína se puede preparar *in situ* en el sujeto a tratar. A este respecto, las secuencias de nucleótidos que codifican dicha proteína se pueden administrar mediante el uso de técnicas no virales (p.ej., mediante el uso de liposomas) y/o técnicas virales (p.ej., mediante el uso de vectores retrovirales), de forma que dicha proteína se expresa a partir de dicha secuencia de nucleótidos.

En una realización preferida, el compuesto farmacéutico de la presente invención se administra de manera tópica. Por lo tanto, preferiblemente, el compuesto farmacéutico está en una forma que es adecuada para la administración tópica.

Administración

El término "administrado" incluye la administración mediante técnicas virales o no virales. Los mecanismos de administración viral incluyen, pero sin limitación, vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados (AAV), vectores herpes virales, vectores retrovirales, vectores lentivirales, y vectores baculovirales. Los mecanismos de administración no virales incluyen la transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, moléculas anfipáticas faciales catiónicas (CFAs) y combinaciones de los mismos.

Los componentes de la presente invención se pueden administrar solos, pero en general se administrarán en forma de una composición farmacéutica - p.ej. cuando los componentes están en una mezcla con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica habitual.

Por ejemplo, los componentes se pueden administrar (p.ej. de manera oral o tópica) en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsátil o controlada.

Si el producto farmacéutico es un comprimido, el comprimido puede contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato magnésico, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilen glicoles de peso molecular elevado. Para las suspensiones acuosas y/o elixires, el agente se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materiales colorantes o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión, y con diluyentes tales como agua, etanol, propilen glicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, uno o más de: oral (p.ej. como un comprimido, cápsula, o como una disolución para ingestión), tópica, mucosa (p.ej. como un spray o aerosol nasal para inhalación), nasal, parenteral (p.ej. mediante una forma inyectable), gastrointestinal, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intraocular, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutánea, oftálmica (que incluye intravítrea o intracameral), transdérmica, rectal, bucal, vaginal, epidural, sublingual.

En un aspecto preferido, la composición farmacéutica se administra de manera tópica.

Se debe entender que no todos los componentes del compuesto farmacéutico tienen que ser administrados mediante la misma vía. De forma similar, si la composición comprende más de un componente activo, esos componentes se pueden administrar mediante vías diferentes.

Si un componente de la presente invención se administra de manera parenteral, los ejemplos de tal administración incluyen uno o más de: la administración de manera intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea del componente; y/o mediante el uso de técnicas de infusión.

Para la administración parenteral, el componente se usa mejor en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas se deberían tamponar de manera adecuada (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se lleva a cabo fácilmente mediante técnicas farmacéuticas habituales muy conocidas para los expertos en la técnica.

Tal como se indica, el/los componente(s) de la presente invención se puede(n) administrar de manera intranasal o mediante inhalación, y se administra(n) de manera conveniente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, spray o nebulizador con el uso de un propelente adecuado, p.ej. diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A[™]) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA[™]), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, bomba, spray o nebulizador puede contener una disolución o suspensión del compuesto activo, p.ej. mediante el uso de una mezcla de etanol y el propelente como disolvente, que puede contener además un lubricante, p.ej. trioleato de sorbitán. Se pueden formular cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para el uso en un inhalador o insuflador para que contengan una mezcla en polvo del agente y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Preferiblemente, el/los componente(s) de la presente invención se puede(n) administrar en forma de un supositorio u óvulo vaginal, o se puede(n) aplicar de manera tópica en forma de un gel, hidrogel, loción, disolución, crema, pomada o polvo dispersable. El/los componente(s) de la presente invención también se puede(n) administrar de manera dérmica o transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo. También se pueden administrar por vía pulmonar o rectal. También se pueden administrar por vía ocular. Para el uso oftálmico, los compuestos se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica, de pH ajustado, o, preferiblemente, como disoluciones en solución salina estéril isotónica, de pH ajustado, opcionalmente en combinación con un conservante tal como un cloruro de bencilalconio. De manera alternativa, se pueden formular en una pomada, tal como petrolato.

Para la aplicación de manera tópica a la piel, el/los componente(s) de la presente invención se puede(n) formular como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto, por ejemplo, en una mezcla con uno o más de lo siguiente: aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilen glicol, compuesto de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionante y agua. De manera alternativa, se puede formular como una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta, por ejemplo, en una mezcla de uno o más de lo siguiente: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilen glicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencilico y agua.

Combinaciones Farmacéuticas

5 El Trabid o inhibidor(es) de Trabid de la presente invención se pueden administrar con una o más sustancias farmacéuticamente activas. A modo de ejemplo, la presente invención cubre los tratamientos simultáneos o secuenciales con un agente según la presente invención y uno o más esteroides, analgésicos, antivirales u otra(s) sustancia(s) farmacéuticamente activa(s).

Se entenderá que estos regímenes incluyen la administración de las sustancias de manera secuencial, simultánea o juntas.

Niveles de Dosis

10 En general, un médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un sujeto individual. El nivel de la dosis específica y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente particular se puede variar, y dependerá de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la longitud de acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y momento de la administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular, y la terapia a la que está sometido el individuo.

15 Dependiendo de la necesidad, el agente se puede administrar a una dosis de 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

Formulación

20 El/los componente(s) de la presente invención se puede(n) formular en una composición farmacéutica, tal como mezclando con uno o más de un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, mediante el uso de métodos que se conocen en la técnica.

Tratamiento

25 Se debe apreciar que todas las referencias en la presente memoria al tratamiento incluyen uno o más de tratamiento curativo, paliativo y profiláctico. Preferiblemente, el término tratamiento incluye al menos el tratamiento curativo y/o el tratamiento profiláctico. El tratamiento puede ser de uno o más de los trastornos mencionados en la presente memoria, o una dolencia relacionada.

Aplicaciones adicionales

La invención tiene aplicación en cánceres asociados a defectos en la ruta de señalización de Wnt.

La invención puede tener aplicación en el carcinoma hepatocelular (HCC), tumor de Wilm (WT), tumor desmoide, meduloblastoma, y cáncer de tiroides, tal como cáncer anaplásico de tiroides.

30 La invención puede tener aplicación en tumores de ovario y endometrio, síndrome de Denys-Drash, melanoma y cáncer de próstata.

Preferiblemente, la invención tiene aplicación en cualquier trastorno asociado a una transcripción aumentada de TCF/LEF.

35 Preferiblemente, la invención tiene aplicación en cualquier trastorno asociado a la estabilización y/o activación de β -catenina.

40 Preferiblemente, las indicaciones médicas son indicaciones para inhibidores de Trabid y/o para la reducción de la actividad de Trabid. La reducción de la actividad de Trabid en el contexto de las realizaciones de ensayo en general se refiere a la actividad bioquímica del polipéptido Trabid reducido mediante otro(s) componente(s) del ensayo, por ejemplo un inhibidor candidato. Sin embargo, la reducción de la actividad de Trabid en el contexto de la manipulación de células u organismos puede referirse además a la reducción de los niveles de Trabid, tal como la reducción de la expresión de Trabid, el incremento de la degradación de Trabid, el incremento de la eliminación o la captura de Trabid u otro medio para reducir la actividad de Trabid reduciendo su presencia o cantidad/concentración.

45 En la técnica, el único papel conocido de la ubiquitilación en la ruta de Wnt fue el asociado al recambio de proteínas, en especial el de β -catenina. En la presente memoria se informa de un segundo y diferente papel de la ubiquitina en esta ruta, basándose en el descubrimiento de que la respuesta de Wnt de las células de mamífero depende de Trabid, una enzima de unión de ubiquitina y enzima desubiquitilante con preferencia por la ubiquitina unida por K63. Se usó la reducción mediada por ARNi para demostrar que estas actividades de Trabid son necesarias para la transcripción eficaz dependiente de TCF en líneas celulares humanas estimuladas a través de Wnt. Además, la delección selectiva de Trabid de Drosophila reveló su papel en la respuesta a Wingless ectópico, lo que sugiere que
50 Trabid es un regulador positivo conservado de la ruta de Wnt. Finalmente, también se examinaron otras rutas de señalización, que incluyen la señalización mediante NF-kappaB en células de mamífero, y el receptor de EGF y la señalización mediante Notch en Drosophila, pero no se descubrió ningún efecto de la pérdida de Trabid en estos, lo

que sugiere que Trabid no afecta en general a la señalización.

Se demuestra que Trabid es una auténtica DUB, capaz de escindir ubiquitina unida por K63 in vitro e in vivo. Esta actividad reside en su dominio OTU, que posee una actividad DUB intrínseca. Los ortólogos de Trabid exhiben una sustitución de aminoácidos conservada de un aspartato por otra parte invariable, y así es sorprendente que este dominio de OTU variante de los ortólogos de Trabid sea catalíticamente activo. Se describe que la díada catalítica que comprende Cys443 e His628 en el dominio OTU es crucial para la actividad DUB de Trabid.

De manera interesante, la actividad DUB in vivo de Trabid depende además de la unión a ubiquitina unida por K63 conferida por los motivos de NZF N-terminales de Trabid. Estos motivos exhiben un grado sin precedentes de preferencia por la unión a ubiquitina unida por K63 frente a la unida por K48. Se demuestra que estos motivos de NZF son necesarios para la función de Trabid en la transcripción mediada por TCF, pero no para su actividad DUB intrínseca in vitro, así que estos motivos pueden tener una función auxiliar in vivo. Los motivos de NZF de Trabid pueden servir para unirse a y adquirir proteína(s) ubiquitilada(s) de manera eficaz como sustrato(s) para la actividad DUB del dominio OTU unido.

Trabid es un regulador positivo de la transcripción mediada por Wnt de los genes objetivo de TCF. Trabid es necesario para la transcripción dependiente de TCF, pero no para la estabilización de la beta-catenina, en las células estimuladas por Wnt. En apoyo de esto, la transcripción mediada por TCF de células de cáncer colorrectal HCT-116 (que albergan una mutación activante de beta-catenina) depende de Trabid. Evidentemente, el único efector de Wnt modificado mediante ubiquitina claramente establecido, beta-catenina, no es un objetivo directo de la actividad DUB de Trabid. Esto es completamente coherente con la preferencia de Trabid hacia la ubiquitina unida por K63 sobre la ubiquitina unida por K48, lo cual va contra una función directa de Trabid en la degradación proteosómica.

Se demuestra que Trabid es prescindible para la actividad transcripcional de las construcciones de LEF1 que están directamente fusionadas a TADs - el TAD de la proteína viral VP16, o el extremo C-terminal de beta-catenina, que adquiere una diversidad de cofactores transcripcionales. Así, Trabid controla la adquisición de co-activadores del complejo TCF-beta-catenina en los genes objetivo de TCF durante la señalización de Wnt.

Las reducciones pequeñas pero coherentes de los niveles nucleares de beta-catenina, TCF3 y TCF4 observadas en las células con reducción de Trabid pueden reflejar un papel de Trabid en la retención nuclear de estas proteínas. Sin embargo, la re-expresión de TCF4 y beta-catenina no supera la necesidad de Trabid de estas células.

Se ha demostrado que Trabid es necesario también para la transcripción eficaz mediada por TCF en células de cáncer colorrectal cuya actividad de la ruta de Wnt es hiperactiva debido a la inactivación mutacional de APC, o a la activación de beta-catenina. Esto es completamente coherente con el análisis de epistasia, que coloca la función de Trabid después de la beta-catenina activada. Curiosamente, se descubrió que el Trabid sobreexpresado se acumulaba en los núcleos de células SW480, lo que sugiere un vínculo entre su presencia nuclear elevada y su función en la transcripción.

Los resultados implican que Trabid es un objetivo molecular para fármacos inhibitorios en las células de cáncer colorrectal. Las ventajas incluyen, en primer lugar, que Trabid actúa en la ruta de Wnt, pero no tiene efectos generales en otras rutas de señalización y transcripción. En segundo lugar, la actividad DUB de Trabid es crítica para su función en la transcripción mediada por TCF, y las proteasas son objetivos atractivos para los inhibidores específicos. En tercer lugar, Trabid parece tener un único bolsillo catalítico, dada su sustitución D>A conservada en la tríada catalítica Asp Cys His hallada habitualmente en las cisteín proteasas, por lo que existe la posibilidad de inhibidores específicos que exhiban preferencia en la unión a este bolsillo respecto del de otras proteasas, lo que incluye otros dominios OTU, que funcionan en otras rutas.

Se descubrió que la reducción de Trabid fue acompañada por una reducción en los niveles de TCF3 y TCF4 en células renales embrionarias humanas. En particular, TCF3 desempeña un papel en el mantenimiento de las células madre cutáneas en un estado indiferenciado incluso en ausencia de señalización de Wnt, y TCF4 es necesario para el mantenimiento de los compartimentos de la célula madre en el epitelio intestinal. Dados los niveles elevados de Trabid en estos compartimentos y el papel de Trabid en la estimulación de la actividad del complejo TCF-beta-catenina en la transcripción, Trabid puede tener aplicación en la renovación y/o la diferenciación de las células madre.

Descripción Breve De Las Figuras

La Figura 1 muestra una ilustración esquemática de un ensayo en microplaca.

La Figura 2 muestra curvas de inhibición competitiva.

La Figura 3 muestra tres gráficos de barras y dos fotografías.

La Figura 4 muestra un diagrama, secuencias y fotografías.

La Figura 5 muestra fotografías.

La Figura 6 muestra gráficos de barras y fotografías.

La Figura 7 muestra fotografías.

Figura 8. Trabid es una DUB con preferencia por ubiquitina unida por K63

5 (A) Dominios de Trabid humano, y alineación de las cisteínas e histidinas invariables (sombreadas en negro) de tres miembros de la familia OTU humana (se muestra la sustitución C443S catalíticamente inactiva); obsérvese el aspartato del sitio activo (recuadrado) hallado en la mayoría de proteínas OTU, pero sustituido por alanina en los miembros de la familia de Trabid. (B) ensayo de DUB, con Trabid WT y mutante marcado con HA inmunoprecipitado de células 293T transfectadas, como se indica, incubado con ubiquitina unida por K48 o K63 (UB2-7); el asterisco indica la proteína ubiquitilada co-inmunoprecipitada con la C443S catalíticamente inactiva. (C) ensayos de DUB in vitro, con fragmentos C- o N-terminales de Trabid WT o mutante marcados con GST expresados en bacterias (izquierda; véase también la Fig. 9B), incubados con ubiquitina unida por K63 (UB2-7; derecha); Ub-Al, ubiquitina-aldehído.

Figura 9. Unión preferente de Trabid a ubiquitina unida por K63 por medio de sus motivos de NZF

15 (A) Ensayos de unión de ubiquitina, con HA-Trabid WT y mutante inmunoprecipitado de células 293T transfectadas, e incubadas in vitro con ubiquitina unida por K48 o K63 (UB2-7); el asterisco indica la proteína ubiquitilada co-inmunoprecipitada con WT y C443S (véase también la Fig. 8B). (B) Ensayos de arrastre, con un fragmento N-terminal marcado con GST de Trabid (véase también la Fig. 8C) expresado en bacterias (izquierda), e incubado con ubiquitina unida por K48 o K63; obsérvese la preferencia de unión intensa por las cadenas unidas por K63 (carriles 5 y 6).

20 Figura 10. La reducción mediada por ARNi de Trabid provoca la pérdida de la transcripción dependiente de TCF

(A) Transferencia de Western, que muestra la reducción de la proteína Trabid endógena en células 293 transfectadas con siARN de control y siARN específico de Trabid (control interno, α -TLE). (B, C) Ensayos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real, tras la transfección de células 293 con siARNs como en (A), monitorizando la reducción de los transcritos de Trabid (izquierda), y los niveles de transcritos de los genes objetivo de Wnt AXIN2, BCL9 y c-MYC, como se indica, tras el tratamiento de las células con medio de control (L-CM) o medio acondicionado con Wnt3A (W3a-CM). (D) Ensayos de luciferasa TOPFLASH, tras la transfección de células SW480 con siARNs, con o sin la re-expresión de construcciones de rescate de siARN de Trabid marcado con HA de tipo WT y mutante, como se indica; también se muestran los valores de FOPFLASH de un indicador de luciferasa de control que contenía sitios de unión de TCF mutantes. Los valores de luciferasa relativos se expresan como inducción en porcentaje (eje y); debajo, las transferencias de Western, que muestran la expresión de HA-Trabid de un experimento representativo (α -tubulina, controles de carga). (D) Ensayos indicadores de luciferasa dependiente de NF- κ B, en células 293T transfectadas con siARNs como en (A), y co-transfectadas con los vectores de expresión como se indica (debajo, transferencias de Western que muestran los niveles de expresión). Barras de error en esta y en las figuras posteriores, desviaciones estándar de la media, de 2-3 experimentos independientes (llevados a cabo por duplicado).

Figura 11. Los experimentos de epistasia indican una función nuclear de Trabid

40 Ensayos TOPFLASH en células 293T, transfectadas con siARNs como en la Fig. 10B, y co-transfectadas con (A) HA-Wnt3A, (B) FLAG- β -TrCP negativo dominante (Δ F) o (C) FLAG- β -catenina estabilizada (Δ 45S); debajo, transferencias de Western de experimentos representativos, que muestran los niveles de expresión de β -catenina endógena (A) o proteína sobreexpresada (B, C).

Figura 12. La reducción de Trabid va acompañada por niveles reducidos de TCF4 y TCF3

45 (A) Transferencia de Western de las fracciones citoplasmática y nuclear de células 293T, transfectadas con siARNs como en la Fig. 10B, y tratadas durante 4 hrs con DMSO (control), MG132 10 μ M ó LiCl 20 mM, 24 hrs después de la transfección, analizadas con sonda de manera secuencial con los anticuerpos indicados a la derecha. (B) Transferencia de Western (analizada con una sonda de manera secuencial) de las fracciones nucleares de células 293, preparadas y tratadas con siARNs como en (A). (C) Co-inmunoprecipitaciones de las fracciones nucleares de células 293 (10 μ g) preparadas como en (A); IP, anticuerpo de α -TCF4; transferencia de Western, anticuerpo de α - β -catenina.

Figura 13. Trabid es prescindible para la transactivación mediante quimeras LEF1-TAD

50 Ensayos TOPFLASH en células 293T, transfectadas con siARNs como en la Fig. 10B, y co-transfectadas con 1-100 ng de vector vacío o quimeras LEF1, como se indica (los niveles de expresión de las quimeras se calibraron, para dar como resultado niveles comparables de transactivación); debajo, transferencias de Western de un experimento representativo, analizadas con una sonda de anticuerpo de α - β -catenina que muestra los niveles de expresión de catC-LEF1 Δ 56 (obsérvese que VP16-LEF1 Δ fue indetectable a los niveles de expresión bajos usados para hacer coincidir la actividad inferior \sim 10x de catC-LEF1 Δ 56).

Figura 14. dTrabid es un regulador positivo de la respuesta a la señalización Wnt ectópica

Ojos de moscas *yw*, que expresan (A) GAL4, o (B-D) Wingless, (E, F) Armadillo o (G, H) el inhibidor Argos del receptor de EGF; (A, B, E, G) +/+; (C, F, H) dTrabid/+; (D) dTCF³/+. La heterocigosidad de dTrabid inhibe el fenotipo de ojos rugosos debido a Wingless o Armadillo ectópicos (C, F), pero no debido a Argos (H) o Rhomboid ectópico.

5 Figura 15. El tercer motivo de NZF de Trabid es necesario para su actividad DUB

(A) Transferencia de Western de lisados de células 293T, transfectadas con HA-Trabid WT y mutante C155A, tras la inmunoprecipitación con anticuerpo de α -HA. (B) Ensayos de DUB, con inmunoprecipitados de (A), incubados con ubiquitina unida por K48 o K63 (UB2-7); Se incubaron 20 μ l de las microesferas de Sepharose con las cadenas de ubiquitina durante 1 hr a 30 °C.

10 Figura 16. Alineaciones de motivos de NZF de diferentes proteínas

Los 3 motivos de NZF de Trabid humano están alineados con los motivos de NZF de TAB2 y TAB3 humanos, y Npl4 de rata (el miembro fundador de este motivo); las cisteínas invariables están sombreadas en negro, otros residuos invariables en gris; las primeras cisteínas (subrayadas) se mutaron a alanina en el mutante 3xZn.

Figura 17. Trabid es citoplasmático y nuclear

15 (A) Transferencia de Western de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de células 293, transfectadas con siARNs como en la Fig. 10B, tras el tratamiento de las células con medio de control (L-CM) o medio acondicionado con Wnt3A (W3a-CM), analizado con sonda de anticuerpos como se indica. (B-D) Diferentes líneas de células humanas como se indica, transfectadas con HA-Trabid, fijadas y teñidas con anticuerpo de α -HA y DAPI (para marcar los núcleos). Las células se lavaron con PBS(+) y se fijaron en 1 ml de paraformaldehído del 4% precalentado en PBS(-) durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se permeabilizaron con un 0,5% de Triton X-100 en PBS(-) durante 10 min, se bloquearon con un 5% de suero de cabra normal durante 20 min, seguido de incubación durante 2 h con α -HA (diluido en PBS(+) que contenía un 1% de suero de cabra). Las células se lavaron dos veces con PBS(+) (10 min por lavado) y posteriormente se incubaron con anticuerpo de cabra secundario de rata Alexa⁴⁸⁸- α (Molecular Probes) durante 40 min y se lavaron 3 veces con PBS(+). Se montaron cubreobjetos sobre los portaobjetos de vidrio mediante el uso de Vectashield con DAPI (Vector Laboratories). Se visualizó la fluorescencia con un microscopio confocal MRC 1024, y se escanearon las imágenes a un aumento de x600. Obsérvese la acumulación nuclear de HA-Trabid en las células SW480.

20

25

Figura 18. Especificidad de la reducción mediada por ARNi de Trabid

30 (A) Análisis de RT-PCR semi-cuantitativo, que muestra los niveles de los transcritos de Trabid endógeno en células 293T transfectadas con siARNs como en la Fig. 10D. (B) Transferencias de Western de lisados de células 293T transfectadas con siARNs como en la Fig. 10D, y co-transfectadas con Cezanne y Trabid marcados con HA, analizados con una sonda de anticuerpo de α -HA. (C) Transferencias de Western de lisados de células 293T transfectadas con siARNs como en la Fig. 10A, y co-transfectadas con Trabid marcado con HA con mutaciones silenciosas (Δ siARN) que las hacen resistentes a la reducción con siARNs de Trabid.

35 Figura 19. La reducción mediada por ARNi de Trabid provoca la pérdida de la transcripción dependiente de TCF en células 293T estimuladas con Wnt3A

Ensayos TOPFLASH, tras la co-transfección de células 293T con siARNs y construcciones de rescate de Δ siARN de Trabid WT y mutante como en la Fig. 10D, como se indica, con o sin estimulación de Wnt3A como en la Fig. 10B; debajo, transferencias de Western, que muestran los niveles de β -catenina endógena, y construcciones de rescate de Trabid marcado con HA.

40

Figura 20. Trabid actúa después de Dishevelled y GSK3 β

45 (A) Ensayos TOPFLASH de células 293T, transfectadas con dos siARNs diferentes contra Trabid, o siARN contra Cezanne como en la Fig. 10D, y co-transfectadas con vector vacío o FLAG-Dvl2. (B) Ensayos TOPFLASH en células 293T, transfectadas con siARNs como en la Fig. 10B, y co-transfectadas con vector vacío, FLAG-Dvl2 o HA-Wnt3A, o tratadas con LiCl 10 mM durante 4 hrs (carriles 4 y 8).

Figura 21. Trabid es necesario para la transcripción mediada por TCF en células de cáncer colorrectal

Ensayos TOPFLASH de células SW480 o HCT-116 de cáncer colorrectal, tras la transfección con siARN de control, o siARN hacia Trabid (dos siARNs diferentes) o Cezanne, y hacia β -catenina, como comparación.

50

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de las proteínas que median en las funciones del ARD de APC en la señalización de Wnt y la adhesión celular

5 El ARD de E-APC es crítico para su asociación con las uniones adherentes, y para su función en la señalización de Wnt, en particular para su capacidad de formar un complejo con Axin *in vivo* (obsérvese, sin embargo, que los motivos de unión de Axin de las proteínas APC están fuera del ARD). De hecho, estas funciones son eliminadas por una única mutación sin sentido, N175>K (que corresponde a N507 en APC), que se espera que afecte a la unión de ARD a sus ligandos, basándose en consideraciones estructurales.

10 Para identificar las proteínas que median en las funciones del ARD de APC en la señalización de Wnt y en la adhesión celular, se llevó a cabo un cribado de doble híbrido en levadura de una biblioteca embrionaria de ratón con el dominio ARD de tipo natural de APC como cebo, y los aislados se contra-cribaron con el dominio mutante de N507>K. Esto condujo a la identificación de una proteína denominada Trabid.

Las especificidades de la unión de Trabid a ARD de tipo natural frente al mutante se confirmaron posteriormente *in vivo* mediante co-inmunoprecipitación.

15 **Ejemplo 2: La función de Trabid en la señalización de Wnt**

Se demuestra que Trabid es una enzima desubiquitilasa (enzima 'DUB'). Se demuestra además que Trabid estimula la señalización de Wnt en las células de mamífero.

20 El análisis de la pérdida de función, basado en la reducción mediante ARNi, reveló que Trabid (pero no Cezanne) es necesario para la transcripción eficaz mediada por TCF en células de cáncer colorrectal mutantes para APC o β -catenina.

El análisis de epistasia basado en la misma aproximación colocó a Trabid después de la β -catenina activada. De manera importante, la reducción de Trabid no afecta a la transcripción mediada por NF κ B, de manera que su efecto sobre la transcripción mediada por TCF parece ser específico.

25 El dominio OTU de Trabid tiene actividad DUB *in vivo* e *in vitro*, y su región de NZF se une a las cadenas de ubiquitina, con preferencia por las cadenas unidas por K63. En conjunto, estas pruebas sugieren que es crítica una etapa de desubiquitilación para la transcripción eficaz mediada por TCF. El recambio de ubiquitina en los genes objetivo de TCF puede ser necesario para su transcripción sostenida durante la señalización de Wnt. Además, también se identifica Trabid como un objetivo para los fármacos inhibitorios, y se proporcionan métodos para llevar a cabo esto (véanse los ejemplos siguientes)

30 **Ejemplo 3: Caracterización Bioquímica Y Biológica**

Trabid se ha caracterizado bioquímicamente según la presente invención. Esto ha confirmado los elementos de su función indicados anteriormente, y ha permitido el desarrollo posterior de los ensayos y aplicaciones de la invención.

35 La Figura 3 muestra una diversidad de resultados bioquímicos que establecen la función de Trabid. En particular, las Figuras 3 (a) y (b) muestran los efectos transcripcionales mediados por Trabid. Además, se demuestra que la inhibición de Trabid disminuye la transcripción mediada por TCF.

De manera específica, la reducción de Trabid está mediada por diferentes inhibidores de Trabid. En este ejemplo, los dos inhibidores de Trabid usados son siARNs hacia Trabid. Las dos secuencias de siARN son: AGA GGT GTC TCA ACA AGC A (nº 1) y AGA GGC TTC TTC AAT AAT A (nº 2).

40 Estos inhibidores reducen cada uno la transcripción de TCF estimulada por Dvl en células 293T (Fig 3a), y en las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT-116 y SW-480 (Fig 3b).

Los experimentos de epistasia en células 293T revelan una función para Trabid en la regulación transcripcional.

Se demuestra que el extremo N-terminal de Trabid que contiene tres dedos de NZF se une de manera preferente a cadenas de ubiquitina K63 en un ensayo de arrastre con GST (Fig 3d).

45 Además, se demuestra experimentalmente la actividad desubiquitilasa de Trabid, y además se demuestra que esta actividad está asociada al extremo C-terminal de Trabid. Así, el extremo C-terminal alberga el dominio de desubiquitilación OTU; esta actividad de Trabid escinde de manera preferente las cadenas de ubiquitina K63 *in vitro* (véase la Fig 3e).

50 Así, se demuestra que Trabid es una desubiquitilasa que afecta a la señalización de Wnt en las células humanas, y también lo hace en las líneas celulares derivadas de una indicación patológica clave de la invención, es decir, el cáncer colorrectal.

Ejemplo 4: Objetivo(s) molecular(es) de Trabid en la señalización de Wnt

Se generan pruebas adicionales de la conexión funcional entre Trabid y la señalización de Wnt y el cáncer colorrectal.

5 La invención permite identificar la(s) proteína(s) que es/son los sustratos fisiológicamente relevantes de Trabid durante la señalización de Wnt. Las pruebas actuales indican que éstas son proteínas nucleares - tales como β -catenina activada (obsérvese, sin embargo, que la β -catenina activada está fosforilada, y así ya no es un sustrato para la ubiquitilación), Pygopus o Lgs/BCL9, o cualquiera de los otros co-activadores que son adquiridos por β -catenina. Trabid también puede afectar a la actividad transcripcional de β -catenina de manera menos directa, por ejemplo mediante la inhibición de RanBP3, que recientemente se ha demostrado que estimula la exportación nuclear de β -catenina.

10 Se usan anticuerpos contra estas proteínas (Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C. A. y Jones, K. A. *Genes Dev* **20**, 586-600 (2006); Hendriksen, J. et al. *J Cell Biol* **171**, 785-97 (2005)) y transferencia de Western para comprobar la aparición de formas ubiquitiladas dependientes de Trabid tras la reducción mediada por ARNi de Trabid en líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal humano (p.ej. en células SW480 y HCT116), o en células 293T con estimulación de Wnt.

15 La ubiquitilación se confirma mediante la transferencia simultánea con un anticuerpo contra ubiquitina (o contra la ubiquitina marcada sobreexpresada). Estos experimentos se llevan a cabo de manera ventajosa tras el tratamiento de las células con inhibidores de proteosomas (p.ej. MG132), para maximizar la probabilidad de detectar especies ubiquitiladas de corta duración que se espera que aparezcan tras la reducción de Trabid.

20 Estos experimentos proporcionan percepciones de la naturaleza de la etapa de DUB durante la transcripción mediada por TCF, y pueden revelar detalles adicionales del mecanismo mediante el cual tiene impacto en la señalización de Wnt.

Ejemplo 5: Análisis Funcional De Trabid

25 En este ejemplo se amplía el trabajo sobre la pérdida de función de Trabid examinando la expresión de genes objetivo de Wnt endógenos que están estimulados (p.ej. *c-myc*, *CD44*) o inhibidos (p.ej. *Hath1*) en células SW480 y HCT116 de cáncer colorrectal (mutantes para *APC* o β -catenina, respectivamente), o en células 293T con estimulación de Wnt, tras la reducción mediada por ARNi de Trabid (véase el ejemplo precedente).

30 En particular, se examina su velocidad de proliferación en estas condiciones. Para obtener resultados fiables de estos experimentos, puede ser beneficioso generar líneas estables con construcciones de horquillas inducibles (van de Wetering, M. et al. *EMBO Rep* **4**, 609-15 (2003)).

Se ha generado una delección de *Trabid* de *Drosophila* mediante recombinación homóloga.

35 Esto es útil para examinar si esta proteína afecta a la transcripción mediada por TCF durante el desarrollo de *Drosophila*. El análisis de este mutante de *Trabid* se realiza como se describió para Pygopus y Legless/BCL9, componentes nucleares de la señalización de Wnt cuya función es necesaria para la actividad transcripcional de Armadillo/ β -catenina durante el desarrollo y en las células de cáncer colorrectal (véase Thompson B, Townsley FM, Rosin-Arbesfeld R, Musisi H y Bienz M. *Nat Cell Biol* **4**, 367-373 (2002); Kramps, T. et al. *Cell* **109**, 47-60. (2002)).

Se examina si la reducción de Trabid de *Xenopus* mediante la tecnología de grupos morfolino provoca fenotipos similares a Wnt, y si esto afecta a cualquiera de los sucesos de transcripción mediados por TCF durante el desarrollo embrionario (Liu, F., van den Broek, O., Destree, O. y Hoppler, S. *Development* **132**, 5375-85 (2005)).

40 Sin desear limitarse por la teoría, estos experimentos pueden indicar un papel de Trabid en la señalización de Wnt durante el desarrollo. Esto se puede dilucidar adicionalmente generando una eliminación génica condicional de *Trabid* de ratón en el epitelio intestinal (Sansom, O. J. et al. *Genes Dev* **18**, 1385-90 (2004)), para examinar su función en este tejido durante el desarrollo normal y en tumores intestinales. Se podría esperar que la pérdida de *Trabid* diera como resultado una reducción de las células madre del compartimento de las criptas similar a la pérdida de *Tcf-4*, y podría reducir la incidencia y el tamaño de los tumores intestinales en ratones mutantes *Min*, de forma similar a otros genes que estimulan la tumorigénesis intestinal.

Ejemplo 6: Ensayo de Trabid

Las condiciones del ensayo de desubiquitilasa descrito en la Figura 3 son las siguientes:

Se proporciona Trabid y variantes de Trabid a 1,0 μ g cada uno.

50 Se incuban con 1,0 μ g de una mezcla de cadenas de oligo-ubiquitina (Affiniti) en 20 μ l de tampón (KCl 150 mM, Hepes 50 mM, pH 7,4, DTT 10 mM, 5% de glicerol, 0,01% de Triton X-100) durante 60 min a 30 °C.

Las reacciones se terminan con tampón de muestra SDS 2X (20 % de glicerol, TrisHCl 125 mM, pH 6,8, 4 % de

SDS, 0,01 mg/ml de azul de bromofenol, DTT 10 mM).

Las muestras se resuelven mediante SDS-PAGE, y se visualizan.

Los resultados se muestran en la Figura 3.

Así, la actividad de Trabid se ensaya según la presente invención.

5 Ejemplo 7: Cribado de alto rendimiento de inhibidores de Trabid

En este ejemplo, se demuestran métodos para la identificación de inhibidores de Trabid. Se describe por primera vez la actividad biológica de Trabid como una desubiquitilasa. En este ejemplo, se demuestran los métodos para la identificación de inhibidores de la actividad desubiquitilasa de Trabid.

10 Primero se caracterizó la actividad desubiquitilante de Trabid recombinante *in vitro* (véanse los ejemplos anteriores). Ahora se demuestra un ensayo basado en microplaca que es útil en el cribado de inhibidores, tales como inhibidores de moléculas pequeñas, de esta actividad.

En los ejemplos anteriores, se investigó la función de Trabid en la transcripción mediada por TCF. Aquí se desarrolla un ensayo en microplaca de alto rendimiento para la actividad desubiquitilasa ('DUB') de Trabid.

15 Primero, se debería tener en cuenta la actividad DUB de Trabid recombinante *in vitro*. Por ejemplo, se puede optimizar de manera ventajosa su actividad, se puede estudiar su preferencia por el sustrato, y/o se pueden elegir las condiciones para el ensayo según las necesidades del operador.

De manera opcional, el dominio de NZF se puede incluir en el Trabid usado para el ensayo, por ejemplo para aumentar su actividad.

20 Se proporciona una visión de conjunto del fundamento de un ensayo de la invención en la Figura 1. La Figura 1 muestra el diseño resumido de un ensayo en microplaca que se adapta para ensayar la actividad DUB de Trabid como se describe más adelante. Así, en la Figura 1, se proporciona una ilustración esquemática de un ensayo en microplaca descrito en la presente memoria. Las proteínas componentes son ARD (azul), HD2 (rojo) y quimotripsina (verde); estas se indican además en la explicación debajo del diagrama. ARD y HD2 son ambos capaces de inhibir la unión entre GST-ARD inmovilizados en la placa por medio de la interacción de un anticuerpo y HD2 marcado con S, mientras la quimotripsina es incapaz de hacerlo (representada por los bloques individuales mostrados en el lado derecho del diagrama fuera del recipiente de reacción (pocillo de microtitulación); los dos de arriba muestran el símbolo de la inhibición (---)). La construcción GST-dominio ARD se produce de manera recombinante en *E. coli*, y después se une al interior de los pocillos de microtitulación mediante la unión a un anticuerpo anti-GST, que se ha revestido previamente en la superficie interna de dichos pocillos. La Figura 2 muestra las curvas de inhibición competitiva que demuestran una inhibición saturable de la interacción entre GST-ARD y HD2 mediante el uso de ARD sin marcar o HD2 marcado con Tx. La quimotripsina es incapaz de inhibir esta interacción, incluso a una concentración de 20 μ M.

35 Volviendo al método para ensayar Trabid, en resumen se lleva a cabo como sigue: se sintetiza un sustrato de ubiquitina marcado doblemente (p.ej. GST-ub-ub-S), se inmoviliza, y se monitoriza la liberación del marcador de S tras la escisión mediante la adición de Trabid expresado en bacterias. Los pocillos individuales de la placa de microtitulación proporcionan la capacidad de establecer condiciones de ensayo individuales, por ejemplo diferentes inhibidores candidatos de la actividad de Trabid. La liberación del marcador de S en una condición particular indica la presencia de Trabid activo. La ausencia de liberación, o la liberación a un nivel inferior respecto del control de Trabid sin inhibir adecuado, indica la inhibición de la actividad de Trabid.

40 Aunque el formato del ensayo se puede variar de manera ventajosa según las necesidades del operador, este ejemplo describe un ensayo preferido basado en una construcción GST-Trabid-dominio OTU expresada en bacterias (aminoácidos de Trabid 355-708) que escinde cadenas de ubiquitina K63 *in vitro*, una actividad que se puede eliminar mediante una mutación en la tríada catalítica supuesta (C443A) del dominio OTU (Nanao, M. H. et al. *EMBO Rep* 5, 783-8 (2004)).

45 En una primera etapa, se genera un sustrato de poli-ubiquitina marcado doblemente mediante el uso de los métodos y reactivos conocidos en la técnica (Pickart, C. M. y Raasi, S. *Methods Enzymol* 399, 21-36 (2005)). Este sustrato se inmoviliza en placas de microtitulación mediante uno de los marcadores, preferiblemente el marcador GST N-terminal. El ensayo se simplifica de manera ventajosa mediante el uso de un sustrato de poli-ubiquitina marcado doblemente. Este sustrato se puede unir directamente al pocillo de microtitulación mediante un marcador, de manera ventajosa evitando la necesidad de (anti-G-ST)-a-(GST-sustrato)-a-(marcador detectable) u otro montaje similar para la inmovilización. El segundo marcador se usa de manera ventajosa en la detección de la liberación tras la escisión de Trabid (si se da).

A continuación, se aplican inhibidor(es) candidato(s) y/o vehículo(s) y/o inhibidor(es) conocido(s) a los pocillos adecuados de ensayo y de control, respectivamente.

Si es necesario, el tampón se ajusta para permitir la actividad de Travid (si fuera posible). Preferiblemente, el tampón es como el del ejemplo 6.

A continuación, se añade Travid.

5 A continuación, las placas se incuban para permitir que tenga lugar cualquier acción de Travid. Preferiblemente, las placas se incuban como en el ejemplo 6.

Opcionalmente, las reacciones se paran mediante la inactivación de Travid y/o la adición de un inhibidor conocido a todos los pocillos. De manera alternativa, las reacciones se pueden parar mediante el uso de tampón de muestra SDS como en el ejemplo 6.

A continuación, se leen las placas.

10 La lectura del ensayo es por medio de la detección de la liberación del marcador (preferiblemente el marcador C-terminal) en el sobrenadante tras la escisión mediante Travid, mediante la comparación con la liberación reducida (o incluso la ausencia de liberación) cuando se inhibe Travid (o está inactivo/ausente en los pocillos de control).

15 En las realizaciones alternativas, se podrían usar derivados de ubiquitina fluorescentes como sustratos, tales como los conocidos en la técnica (p.ej., véase Tirat, A. et al. *Anal Biochem* **343**, 244-55 (2005)). En estas realizaciones, la lectura del ensayo sería por medio de la monitorización de la liberación (o la ausencia de liberación) de la fluorescencia tras la acción de la desubiquitinasa (o la ausencia de dicha acción).

20 El mutante de Travid C443A inactivo sirve como control negativo útil en este ensayo. En particular, para calibrar el ensayo, se puede tomar como valor inicial el nivel de liberación del resto detectable en presencia del mutante de Travid C443A catalíticamente inactivo. El nivel de liberación en presencia de la preparación de Travid catalíticamente activo (sin ningún inhibidor o inhibidor candidato) se puede considerar el control positivo. Las muestras de ensayo en presencia de inhibidores candidatos se pueden comparar entonces con los controles positivos y negativos (valores iniciales) para ayudar en la interpretación de los resultados y la identificación de los inhibidores de la función de Travid.

25 Este ensayo permite de manera ventajosa el cribado de bibliotecas de moléculas pequeñas en busca de inhibidores de la actividad DUB de Travid. Travid es un objetivo bioquímico prometedor para los inhibidores de moléculas pequeñas, dada la estructura conocida del dominio OTU (Nanao, M. H. et al. *EMBO Rep* **5**, 783-8 (2004)) y la existencia de inhibidores específicos de este dominio (Balakirev MY, Tcherniuk SO, Jaquinod M y Chroboczek J. *EMBO Rep* **4**, 517-22 (2003) - preferiblemente los compuestos a cribar se basan en los inhibidores descritos en ese documento).

30 Además, debido a que es probable que la sustitución D>A conservada en la triada catalítica (Makarova, K. S., Aravind, L. y Koonin, E. V. *Trends Biochem Sci* **25**, 50-2 (2000)) influya en la arquitectura concreta del sitio activo de Travid, la invención permite de manera ventajosa que se identifiquen los inhibidores que reconocen de manera específica la forma única del dominio OTU de la(s) proteína(s) Travid.

35 Los inhibidores identificados mediante estos cribado(s) se pueden ensayar de manera ventajosa y validar *in vitro* e *in vivo* en los ensayos descritos anteriormente.

Así, este ejemplo describe la caracterización bioquímica adicional de Travid y de los inhibidores de moléculas pequeñas de su actividad DUB. Además, se demuestran los ensayos de inhibidores de la actividad de Travid.

Ejemplo 8: Travid es una Enzima Desubiquitilante Implicada en la Señalización de Wnt

Resumen:

40 El control negativo de la señalización de Wnt en las células de mamífero se mantiene mediante la selección constitutiva como objetivo de β -catenina para la fosforilación (mediante un complejo proteico que incluye APC, Axin y GSK-3 β) y la ubiquitilación (mediante la E3 ubiquitina ligasa (β -TrCP)). La β -catenina ubiquitilada es degradada finalmente por el proteosoma. La activación de la ruta de Wnt da como resultado la inactivación inducida por las proteínas Dishevelled del complejo de fosforilación de β -catenina. La β -catenina sin fosforilar es resistente a la
45 degradación, y así se acumula rápidamente y se transloca al núcleo. La β -catenina nuclear se une a y co-activa los factores de transcripción TCF/Lef para controlar la expresión de los genes objetivo de Wnt.

Resultados

50 En un cribado de doble híbrido en levadura con el componente de señalización de Wnt negativo APC como cebo, se ha identificado una proteína de ratón con una función biológica previamente desconocida, denominada Travid. Travid pertenece a la familia de OTU (tumor ovárico) de enzimas desubiquitilantes, que incluye A20 y Cezanne. Se demuestra que Travid posee una actividad desubiquitilante, y que además se une de manera preferente a las cadenas de ubiquitina unida por K63 *in vitro*. La reducción de Travid de células HEK-293T mediante ARNi dio como resultado una pérdida significativa de la respuesta de estas células a los diversos componentes de Wnt positivos. De

manera importante, la reducción de Trabid no afectó a la transcripción de promotores de control tales como CMV o NF-κB. Los experimentos de epistasia indican una función para Trabid en la señalización de Wnt nuclear. Se descubrieron niveles reducidos de factores de transcripción de TCF en las células con reducción de Trabid, lo que demuestra el uso de Trabid en la reducción de la sensibilidad de las células de mamífero, tales como células 293T, a la señalización de Wnt.

5

Ejemplo 9: Trabid es una enzima desubiquitilante.

La Figura 4 muestra pruebas que demuestran la actividad desubiquitilasa de Trabid.

La Figura 4(A) muestra la composición del dominio de hTrabid y la alineación de las cajas CYS y HIS conservadas de tres miembros de la familia OTU.

10 Se generó un mutante de Trabid proteolíticamente inactivo (Figura 4C, carril 3) sustituyendo la Cys443 catalítica por Serina.

La Figura 4(B) muestra que el extremo N-terminal de Trabid que contiene tres NZFs (dedos de zinc de tipo RanBP2) se une de manera preferente a cadenas de ubiquitina K63 en un ensayo de arrastre con GST (carril 6).

15 La Figura 4(C) muestra que el extremo C-terminal de Trabid que alberga el dominio de desubiquitilación de OTU escinde de manera preferente las cadenas de ubiquitina K63 in vitro. Explicación: Ub-Al, ubiquitina-aldehído: inhibidor de desubiquitilasa.

Ejemplo 10: Trabid es un componente positivo de la señalización de Wnt.

La Figura 5 muestra los resultados de experimentos con ARNi en células 293T que demuestran que Trabid es un componente positivo de la señalización de Wnt.

20 La Figura 5(A) muestra la especificidad y la eficacia de los siARNs. Esto se determinó mediante transferencia de Western de Trabid y Cezanne marcados con HA y expresados de manera ectópica, y mediante RT-PCR para determinar el nivel de reducción del mRNA de Trabid endógeno.

La Figura 5(B) muestra que la reducción de Trabid mediada por dos siARNs diferentes (Trab1 y Trab2) reduce de manera significativa la transcripción de TCF estimulada por Dvl (TOPFLASH). FOPFLASH = control negativo.

25 **Ejemplo 11: Función de Trabid en la regulación transcripcional**

La Figura 6 muestra los experimentos de epistasia en células 293T que demuestran una función para Trabid en la regulación transcripcional.

30 La Figura 6(A) muestra que la estimulación mediante Wnt-3A, Dvl2 y LiCl de la transcripción de TCF se atenuó en las células con reducción de Trabid, al igual que la activación de la transcripción de TCF mediante un β-TrCP negativo dominante (ΔF) (Figura 6B) o un mutante de β-catenina estabilizado (Δ45S) (Figura 6C).

La Figura 4(D) muestra que, en contraste, la reducción de Trabid no tuvo efecto sobre la estimulación inducida por TNFR de la transcripción de NF-κB. Lo mismo es cierto para la transcripción controlada por el promotor de CMV.

Estas pruebas demuestran un papel específico de Trabid en la señalización de Wnt.

Ejemplo 12: Efecto de la reducción de Trabid sobre la ruta de Wnt

35 La Figura 7 muestra el efecto de la reducción de Trabid sobre los niveles celulares de los componentes de la ruta de Wnt y los genes objetivo de Wnt en células de mamífero (en este ejemplo, células 293T).

La Figura 7(A) muestra una reducción significativa de los niveles de los factores de transcripción de TCF 3 y 4 (pero no Lef1) que se observaron en las fracciones nucleares de las células con reducción de Trabid.

40 Se demuestra además que Trabid tiene actividad E3 ubiquitina ligasa. Se presentan pruebas de esto en la Figura 7. En particular, la beta-catenina menos ubiquitilada y la proteína total menos ubiquitilada tras la reducción de Trabid en la Figura 7A demuestran esta actividad. La inhibición o reducción de esta actividad es útil para la reducción de la actividad de la ruta de Wnt. Esta actividad está mediada probablemente por la región de dedos de NZF de Trabid.

45 Las especies ubiquitiladas destacadas de β-catenina son detectables tras la inhibición del proteosoma (MG132, carriles 3 y 7), pero es menos pronunciada en las células con reducción de Trabid (carriles 4 y 8). Se observa una reducción de las proteínas ubiquitiladas totales (antiubiquitina).

La Figura 7(B) muestra que la expresión de c-MYC, un gen objetivo de TCF, está inhibida en las células con reducción de Trabid. Así, la invención se refiere a la inhibición de c-MYC mediante la reducción de la actividad de Trabid.

Resumen

Se ha identificado que Trabid es una enzima desubiquitilante (y E3 ubiquitina ligasa), que es necesaria para la respuesta completa a la estimulación de la ruta de Wnt y la transcripción dependiente de TCF en las células de mamífero. Las pruebas apuntan a un papel nuclear de Trabid, tal como un regulador de la expresión de TCF-3/4. Los niveles reducidos de TCF-3/4 en las células con reducción de Trabid pueden ser el factor limitante de la velocidad que podría explicar la inhibición de la activación de la ruta de Wnt, incluso cuando se usa una forma estabilizada de β -catenina (Fig. 6C). Trabid puede ser necesario también para la ubiquitilación eficaz de β -catenina (Fig. 7A). Así, el recambio regulado de la β -catenina nuclear puede ser importante para la transcripción continua de TCF. La actividad de las enzimas desubiquitilantes es importante para la transcripción de TCF. Se ha identificado que Trabid como tal es una enzima que puede regular los niveles de proteínas específicas de la ruta de Wnt, y así directamente afecta a la transcripción dependiente de TCF. Se demuestra la modulación de Trabid en la modulación de la transcripción dependiente de TCF/señalización de Wnt.

Ejemplo 13

El dominio OTU de Cezanne fue uno de los dos aislados en un cribado de doble híbrido en levadura con el dominio de repeticiones de armadillo de APC como cebo que fueron específicos del dominio de tipo natural (WT), pero no se unieron a una versión mutante de él. Esta asociación específica de WT se confirmó mediante la co-inmunoprecipitación de fragmentos de proteínas comparables en células de mamífero y de *Drosophila*. Los experimentos de ARN de interferencia (ARNi) posteriores revelaron que la reducción de Trabid, pero no de Cezanne, afectó a la transcripción mediada por TCF en células de mamífero (véase más adelante). Por lo tanto, los análisis posteriores se centraron en Trabid.

Trabid escinde de manera preferente la ubiquitina unida por K63 in vitro

Trabid tiene una longitud de 708 residuos de aminoácidos, y contiene un dominio OTU en su extremo C-terminal, y tres dedos de zinc de tipo NZF en su extremo N-terminal (Fig. 8A). Estos últimos son una característica determinante de los ortólogos de Trabid, que son también distinguibles de otros miembros de la familia de OTU por su sustitución D>A conservada en el supuesto bolsillo catalítico de su dominio OTU (Fig. 8A, recuadrado). De hecho, el residuo de aspartato sustituido es parte de la tríada catalítica Asp Cys His (Fig. 8A) hallada normalmente en el sitio activo de las cisteín-proteasas, y cruciales por su función. Esto plantea la cuestión de si el dominio OTU variante de los ortólogos de Trabid tiene de hecho actividad DUB.

Ensayos de Escisión de Ubiquitina

Para ensayar esto, se inmunoprecipitó Trabid marcado con hemaglutinina (HA) de células 293T transfectadas y se incubó *in vitro* con poliubiquitina sintética (cadenas que consisten en 2-7 monómeros de ubiquitina; Ub2-Ub7) unidas por medio de K48 o K63 de la ubiquitina. De hecho, HA-Trabid fue capaz de escindir la ubiquitina unida por K63, aunque la actividad se dirigió de manera predominante hacia las cadenas más largas de la mezcla (Ub6, Ub7; Fig. 8B, carril 8). En contraste, no hubo una actividad DUB detectable de HA-Trabid en las cadenas de ubiquitina unidas por K48 (Fig. 8B, carriles 2-5). Como se esperaba, la sustitución de la cisteína catalítica 443 a serina en el dominio OTU (C443S) bloqueó la actividad DUB de HA-Trabid (Fig. 8B, carril 10). De manera interesante, las sustituciones por alanina de la primera cisteína invariable en cada uno de los tres dedos de NZF (3xZnF), o en el tercer dedo solamente (C155A), también bloqueó esta actividad (Fig. 8B, carril 9; Fig. 15). Esto no se debió a los niveles de expresión reducidos de estos mutantes (Fig. 8B, panel inferior; Fig. 15). Esto implica no solamente al dominio OTU de Trabid en su actividad DUB *in vivo*, sino también a su motivos de NZF (véase más adelante).

Para excluir la posibilidad de que la actividad DUB observada fuera debida a otras proteínas que coprecipitaban con HA-Trabid, se llevaron a cabo ensayos de DUB *in vitro* con el extremo C-terminal de Trabid marcado con glutatión-S-transferasa (GST) expresada en bacterias (GST-Trabid CT, aminoácidos 355-708) (Fig. 8C, panel izquierdo). De hecho, GST-Trabid CT WT, pero no su versión mutante C443S, exhibió una actividad DUB sobre las cadenas de ubiquitina unidas por K63 (Fig. 8C, carriles 3, 4), de forma similar al HA-Trabid inmunoprecipitado (Fig. 8B). Además, la pre-incubación de GST-Trabid CT WT con ubiquitina-aldehído, un inhibidor específico de las enzimas DUB, bloqueó su actividad DUB (Fig. 8B, carril 5). Evidentemente, los dedos de NZF de Trabid no son esenciales para la actividad DUB *in vitro* de la proteína expresada en bacterias, posiblemente debido a que este ensayo implica concentraciones relativamente elevadas de proteínas. De hecho, los dedos de NZF de Trabid por sí solos no poseen actividad DUB, ya que un fragmento de proteína expresado en bacterias que abarcaba el extremo N-terminal de Trabid (GST-Trabid NT, aminoácidos 1-354) fue inactivo en el ensayo de DUB (Fig. 8B, carril 6). Se concluye que el dominio OTU de Trabid posee actividad DUB con preferencia por la ubiquitina unida por K63.

Trabid se une preferentemente a las cadenas de ubiquitina unidas por K63 in vitro

Los dedos de zinc N-terminales de Trabid están claramente relacionados con los motivos de NZF de unión a ubiquitina descubiertos en las proteínas adaptadoras TAB2 y TAB3 del complejo de quinasa TAK1 (Kanayama et al., 2004) (Fig. 16). Para ensayar si Trabid se une a ubiquitina, se llevaron a cabo ensayos de arrastre *in vitro* incubando las cadenas de ubiquitina sintéticas con HA-Trabid WT o mutante inmunoprecipitado de células 293T transfectadas. Esto reveló que HA-Trabid WT se unía de manera específica a Ub4-Ub6 unida por K63 pero no a Ub4-Ub6 unida por

K48 (Fig. 9A, flechas; obsérvese que Ub4, Ub5 y Ub6 estuvieron muy enriquecidas en el precipitado en comparación con la entrada; Fig. 9A, carriles 2 y 6). Se observó una unión significativamente menor con los mutantes 3xZnF y C155A (Fig. 9A, carril 8, 12). En contraste, el mutante C443S mostró como mínimo tanta unión a ubiquitina unida por K63 como el WT (Fig. 9A, carril 10). Así, los dedos de NZF de Trabid son motivos de unión a ubiquitina que muestran una preferencia intensa por la ubiquitina unida por K63, mientras el dominio OTU no es necesario para esta unión.

En apoyo de esto, C443S, pero ninguno de los mutantes de NZF, co-precipitó gran cantidad de proteínas ubiquitiladas endógenas de los lisados de células 293T (Fig. 9A, carriles 9 y 10, asterisco; véase también la Fig. 8B, carriles 5 y 10) que son también detectables, aunque en menor grado, en los precipitados WT (Fig. 9A, carriles 5 y 6). Estos representan probablemente sustratos ubiquitilados unidos a los dedos de NZF de HA-Trabid WT, y retenidos por el dominio OTU catalíticamente inactivo del mutante C443S.

Finalmente, se usó un ensayo de arrastre con GST *in vitro* para demostrar que GST-Trabid NT tiene una preferencia intensa por la unión a ubiquitina unida por K63 sobre la unida por K48 (Fig. 9B), lo que indica que este fragmento contiene un dominio que se une a la ubiquitina unida por K63, muy probablemente los motivos de NZF. Basándose en esto, y en la pérdida observada de actividad DUB de los mutantes de NZF (Fig. 8B; Fig. 15B), se concluye que la unión mediada por NZF de Trabid a ubiquitina unida por K63 es necesaria para su actividad DUB eficaz *in vivo*.

Trabid es necesario para la transcripción dependiente de TCF

Se usó ARNi en diferentes líneas de células humanas para examinar el papel de Trabid y Cezanne endógenos en la señalización de Wnt. Se generó un antisuero contra el extremo N-terminal de Trabid, para establecer que Trabid se expresa en las células 293, tanto en las fracciones citoplasmáticas como en las nucleares (Fig. 17A). De forma coherente con esto, también se halla HA-Trabid exógeno tanto en el citoplasma como en el núcleo de estas células, y de las células 293T (Fig. 17B, C). De hecho, en la línea de células de cáncer colorrectal SW480 (cuya ruta de Wnt es activa debido a una inactivación mutacional de APC), se observó HA-Trabid sobreexpresado en gran medida en el núcleo (Fig. 17D).

A continuación, se usaron células 293T transfectadas con HA-Trabid o HA-Cezanne, para ensayar la especificidad de dos siARNs diferentes, y para optimizar su eficacia de reducción (Fig. 18). Se confirmó además que el siARN específico de Trabid, pero no el siARN específico de Cezanne, redujo el nivel de los transcritos de Trabid endógeno en estas células hasta niveles prácticamente indetectables (tal como se determina mediante RT-PCR semicuantitativa; Fig. 18A), y el de la proteína Trabid endógena hasta <50% (Fig. 10A).

Para ver si Trabid es necesario para la transcripción de los genes objetivo de TCF endógenos en las células con estimulación de Wnt, se midieron los niveles de expresión de dos objetivos transcripcionales bien establecidos de la señalización de Wnt, *c-MYC* y *AXIN2*, mediante el uso de RT-PCR cuantitativa. Primero se confirmó que los niveles de transcrito de *c-MYC* y *AXIN2* estaban inducidos >2x en las células 293 transfectadas con un siARN de control tras la exposición a Wnt3A (Fig. 10B, C). También se descubrió que los niveles del factor de señalización de Wnt recién descubierto BCL9 estaban inducidos >2x en estas condiciones (Fig. 10B). Sin embargo, la estimulación inducida por Wnt de los tres genes objetivo de Wnt estaba completamente bloqueada en las células 293 con reducción de Trabid (Fig. 10B, C; obsérvese además la reducción eficaz de los transcritos de Trabid). La reducción de Trabid también redujo la expresión de estos genes objetivo de Wnt hasta un ~50% en las células 293 sin estimular (Fig. 10B, C), lo que quizás refleja un nivel constitutivo bajo de actividad de la ruta de Wnt en estas células. Así, Trabid es necesario para la transcripción de los genes objetivo de TCF endógenos en respuesta a la estimulación de Wnt. Además, se demuestra que la reducción de la actividad de Trabid reduce la señalización de Wnt en las células humanas.

A continuación, se redujo Trabid en células SW480 de cáncer colorrectal, y se monitorizaron los efectos de esto mediante el uso del ensayo TOPFLASH (basado en una luciferasa indicadora unida a múltiples sitios de unión de TCF) como lectura específica y cuantitativa de la actividad de la ruta de Wnt (Korinek et al., 1997 Science Vol. 275, págs. 1784-1787). Se transfectaron células SW480 con siARN de control, o con siARNs específicos de Cezanne o Trabid, y posteriormente con los indicadores de TOPFLASH y un control interno (CMV-Renilla). Se descubrió que la reducción de Trabid redujo la actividad de TOPFLASH hasta un ~40% de los niveles normales de las células SW480, mientras la reducción de Cezanne no tuvo ningún efecto (Fig. 10D). La actividad de una luciferasa indicadora que contenía sitios de unión de TCF mutados (FOPFLASH) no se vio afectada (Fig. 10D). También se planteó la cuestión de si la sobreexpresión de Trabid afectaría a la transcripción mediada por TCF. Se observó un incremento modesto, pero significativo, en la actividad de TOPFLASH en las células con siARN de control co-transfectadas con HA-Trabid WT (Fig. 10D, carriles 1 y 7), pero no se observó ni con C155A ni con C443S (Fig. 10D, carriles 8 y 9). En conjunto, estos resultados indican que Trabid, pero no Cezanne, es un regulador positivo de la transcripción mediada por TCF en estas células de cáncer colorrectal.

Señalización de NF-κB

Dada la asociación funcional intensa de los parientes de Trabid con la señalización de NF-κB, también se ensayó si la transcripción dependiente de NF-κB es sensible a la reducción de Trabid. Se transfectaron células 293T con una

luciferasa indicadora que contenía múltiples sitios de unión de NF- κ B, y estas células se estimularon mediante la co-transfección del receptor II de TNF (TNFR-II), lo que dio como resultado un incremento $\sim 7x$ de la transcripción dependiente de NF- κ B en comparación con el vector de control (Fig. 10E, carriles 1 y 4). Esta actividad no se vio afectada en las células con reducción de Trabid (Fig. 10E, carriles 4 y 10). Los controles adicionales en este experimento incluyeron la co-transfección con una proteína I κ B negativa dominante (I κ B-DN) que bloqueó de manera eficaz la inducción de TNFR-II, y con Wnt3A, que no afectó a este ensayo indicador de NF- κ B (Fig. 10E). Así, Trabid no es necesario para la transcripción mediada por NF- κ B, lo que es coherente con las conclusiones previas basadas en la sobreexpresión de Trabid.

Las actividades de unión de ubiquitina y DUB de Trabid son importantes para su función en la transcripción dependiente de TCF

Para descartar efectos fuera del objetivo de los siARNs de Trabid, se llevaron a cabo experimentos de rescate con Trabid re-expresado. Se introdujeron mutaciones silenciosas en construcciones de rescate de HA-Trabid WT y mutante que las hicieron resistentes a la reducción mediada por ARNi (Fig. 18C). Después se ensayaron estas construcciones en función de su actividad de rescate en células SW480 con reducción de Trabid, y se descubrió que la construcción HA-Trabid WT restableció la actividad de TOPFLASH hasta un $\sim 70\%$ del nivel de las células transfectadas con el control (Fig. 10D, carriles 1, 3 y 10). De manera importante, ni C443S ni C155A fueron capaces de restablecer la transcripción en TOPFLASH en las células con reducción de Trabid (Fig. 10D, carriles 3, 11 y 12), a pesar de tener una expresión a niveles similares al WT (Fig. 10D, panel inferior). Se observaron resultados similares en las células 293 con estimulación de Wnt3A (Fig. 19). En conjunto, estos resultados indican que las actividades de unión de ubiquitina y DUB de Trabid son necesarias para su función durante la transcripción mediada por TCF en las células humanas con una actividad elevada de la ruta de Wnt.

El análisis de epistasia indica que Trabid actúa después de la estabilización de β -catenina

Se llevaron a cabo experimentos de epistasia, basados en los ensayos TOPFLASH en células 293 con reducción de Trabid, para identificar el nivel en la cascada de señalización de Wnt en el que actúa Trabid. En primer lugar, se examinaron células transfectadas con un plásmido que codificaba Wnt3A, que estimula la actividad de TOPFLASH $\sim 6x$ sobre el vector de control (Fig. 18A; obsérvese que la β -catenina se acumula en estas condiciones (Fig. 18A, panel inferior, carriles 1 y 2). En las células transfectadas con siARNs de Trabid, la estabilización inducida por Wnt3A de β -catenina no se vio afectada, pero la actividad de TOPFLASH se redujo hasta un $\sim 30\%$ del nivel en las células de control (Fig. 18A, carriles 2 y 4). Esto sugiere que Trabid actúa después en la ruta de Wnt, después de la estabilización de β -catenina.

Dado su papel en la conjugación a ubiquitina, también se planteó la cuestión de si la actividad de β -TrCP podría verse afectada por la reducción de Trabid. Se usó una forma negativa dominante de β -TrCP de ratón (β -TrCP Δ F) que se une a β -catenina pero no al complejo SCF, y esto se expresó en células 293T, lo que provoca un nivel elevado de actividad de la ruta de Wnt de una manera dependiente de la dosis: la actividad de TOPFLASH se estimuló $\sim 6x$ y $10x$ sobre el vector de control con 200 y 400 ng de construcción transfectada, respectivamente (Fig. 18B, carriles 1 a 3). Sin embargo, en las células con reducción de Trabid, la estimulación de TOPFLASH con la misma cantidad de β -TrCP Δ F transfectado se redujo significativamente (hasta un $\sim 40-50\%$ de los controles; Fig. 18B, carriles 5 y 6), aunque los niveles de β -TrCP Δ F no se vieron afectados (Fig. 18B, panel inferior). También se descubrió que la estabilización de β -catenina como resultado de la sobreexpresión de Dishevelled, o de la inhibición de GSK3 β mediante LiCl, no se vio afectada por la reducción de Trabid, mientras la transcripción de TOPFLASH debida a estos estímulos se redujo hasta un $< 50\%$ (Fig. 20). Se concluyó que Trabid actúa para controlar la actividad transcripcional de β -catenina, más que para su estabilización.

Para demostrar esto directamente, se transfectaron células 293T con una forma activada de β -catenina, β -catenina $\Delta 45S$ ($\Delta 45S$) (Morin et al., 1997 Science, Vol. 275 págs. 1787-1790), que es resistente a la fosforilación, y es así un estimulador potente de la actividad de TOPFLASH ($\sim 35x$ sobre el vector de control; Fig. 11C, carriles 1 y 2). Sin embargo, en las células con reducción de Trabid, la estimulación de TOPFLASH se redujo hasta un $\sim 40\%$ (Fig. 11C, carriles 2 y 4). De manera coherente con esto, se descubrió que la reducción de Trabid en células HCT-116 de cáncer colorrectal (que albergan la misma mutación $\Delta 45S$ (Morin et al., 1997, ibíd.)) dio como resultado una reducción del $\sim 50\%$ de su actividad de TOPFLASH en comparación con las células de control (Fig. 21). Esto corrobora la conclusión de que Trabid es necesario para la actividad transcripcional de β -catenina.

Trabid afecta a los niveles nucleares de β -catenina, TCF-4 y TCF-3

A continuación se planteó la cuestión de si la reducción de Trabid afectaba a la estabilidad, o el estado ubiquitilado, de objetivos nucleares potenciales en la ruta de Wnt. Así, se eliminó Trabid en células 293T cuya ruta de Wnt se estimuló mediante un tratamiento con LiCl, y se prepararon las fracciones citoplasmática y nuclear de estas células, para determinar los efectos de la reducción de Trabid de manera específica en las proteínas nucleares.

Primero se examinaron los niveles de β -catenina, pero el único cambio coherente que se descubrió fue una pequeña disminución de los niveles de β -catenina nuclear en las células con reducción de Trabid, especialmente en las células estimuladas con LiCl (Fig. 12A, C, carriles 11 y 12), mientras los niveles citoplasmáticos de β -catenina, si

acaso, parecieron incrementarse ligeramente en estas células (Fig. 12A; véase también la Fig. 11A). Un efecto similar fue evidente también en extractos nucleares preparados a partir de células 293 con reducción de Trabid (Fig. 12B). Para examinar la ubiquitilación de β -catenina en las células con reducción de Trabid, se trataron células 293T con el inhibidor de proteosoma MG132, lo que da como resultado la aparición de especies de peso molecular elevado, que corresponden a formas ubiquitiladas de β -catenina (Fig. 12A, C, paréntesis). Sin embargo, no hubo incremento de la β -catenina ubiquitilada en las células tratadas con MG132 tras la reducción de Trabid (Fig. 12A, C); si acaso, fue detectable una pequeña disminución de β -catenina ubiquitilada en las fracciones citoplasmáticas con reducción de Trabid (Fig. 12A, carriles 3 y 4). Así, aunque Trabid puede afectar a la retención nuclear de β -catenina en cierta medida, no es necesario para su ubiquitilación, de manera coherente con la conclusión de que Trabid no afecta a la degradación de β -catenina.

También se examinaron los niveles de los factores de TCF en las células con reducción de Trabid. Esto reveló una reducción pequeña pero coherente de los niveles nucleares de TCF3 y TCF4 en células 293T con reducción de Trabid (Fig. 12A, carriles 7 y 8), visible también tras el tratamiento con LiCl y MG132 (Fig. 12A, carriles 9-12). También fue detectable una reducción similar de los niveles de TCF4 nuclear en células 293 con reducción de Trabid (Fig. 12B). En contraste, los niveles nucleares de LEF1, un miembro de la familia de TCF expresado a niveles bajos en estas células, no fueron sensibles a la reducción de Trabid (Fig. 12A, B), ni lo fueron los de la proteína de unión de β -catenina Parafibromina (Fig. 12A, B). Ninguno de estos factores de transcripción mostró ninguna modificación en respuesta a MG132, lo que indica que no están ubiquitilados. Así, el efecto principal de la reducción de Trabid fue una disminución suave pero selectiva de los niveles de proteína de TCF3 y TCF4, los factores de TCF predominantes en estas líneas de células renales embrionarias humanas.

También se examinó si la reducción de Trabid podría afectar a la interacción entre TCF y β -catenina. Así, se inmunoprecipitó TCF4 a partir de extractos nucleares de células 293T, y se detectó la co-precipitación de β -catenina en lisados de control y en células con reducción de Trabid mediante análisis de transferencia de Western. Sin embargo, aunque los niveles de TCF4 y β -catenina disminuyeron tras la reducción de Trabid (véase anteriormente), no hubo ningún cambio detectable en los niveles de β -catenina asociada a TCF4 (Fig. 12C, carriles 7-12). Se concluye que Trabid no es esencial para la asociación de β -catenina con TCF4 en estas células.

La unión directa de los dominios de transactivación de VP16 o β -catenina a LEF1 evita la necesidad de Trabid

Las disminuciones observadas de los niveles de β -catenina y TCF nucleares en las células con reducción de Trabid podrían explicar por qué la transcripción mediada por TCF se reduce en estas condiciones. Sin embargo, esto es poco probable, ya que la sobreexpresión de β -catenina activada, o de factores de TCF, no restablece los niveles normales de la actividad de TOPFLASH en las células con reducción de Trabid; los niveles de estas proteínas no se reducen de manera detectable tras la sobreexpresión (Fig. 11C), lo que indica que Trabid regula principalmente su función en la transcripción, más que sus niveles.

Una posibilidad es que Trabid afecte a la adquisición de co-activadores en el extremo C-terminal de β -catenina asociada a TCF, por sí mismo un potente dominio de transactivación (TAD). De ser así, la unión de un TAD a TCF podría evitar la necesidad de Trabid en la transcripción mediada por TCF. Así, se ensayó una quimera (catC-LEF1 Δ 56; (Hsu et al., 1998 Mol. Cell. Biol. vol. 18, págs. 4807-4818)) en la que el extremo C-terminal de β -catenina se fusionó directamente a LEF1 que carecía de sus 56 residuos N-terminales (necesarios para la unión a β -catenina), que actúa con mediador en la transactivación dependiente de dosis intensa de TOPFLASH en las células 293 transfectadas (Fig. 13, carriles 1-3). También se ensayó de forma similar una quimera activa entre el TAD de la proteína viral VP16 y LEF1 sin su extremo N-terminal (VP16-LEF1 Δ N; (Ishitani et al., 2005 Nat. Cell. Biol. Vol. 7, págs. 1106-1112)) (Fig. 13, carriles 4 y 5). De manera interesante, catC-LEF1 Δ 56 solamente fue muy ligeramente dependiente de Trabid para la transactivación (Fig. 13, carriles 7 y 8), significativamente menos que Δ 45S (Fig. 11C). Además, VP16-LEF1 Δ N no fue dependiente de Trabid en absoluto, mostrando básicamente la misma transactivación dependiente de la dosis de TOPFLASH independientemente de la reducción de Trabid (Fig. 13, carriles 9 y 10). Esto sostiene que Trabid actúa para controlar la adquisición de coactivadores en el complejo TCF- β -catenina.

Trabid de *Drosophila* es un regulador positivo de la respuesta Wingless

Como se mencionó en la Introducción, *Drosophila* posee un único ortólogo de Trabid (*dTrabid*) con una signatura de Trabid típica (Fig. 8A; Fig. 16). Se planteó la cuestión de si la pérdida de *dTrabid* también afecta a la señalización de Wnt en *Drosophila*, delecionando *dTrabid* mediante recombinación homóloga. Sorprendentemente, los mutantes con ausencia de *dTrabid* fueron viables y fértiles, lo que sugiere que *dTrabid* puede funcionar de manera redundante con otro gen.

Así, se ensayó la función de *dTrabid* en un ensayo más sensible, planteando la cuestión de si disminuir la dosis de Trabid a la mitad (en heterocigotos de *dTrabid*) afectaría al fenotipo de ojos rugosos provocado por la expresión de Wingless en el disco imaginal del ojo (Fig. 14A, B). De hecho, este fue el caso: la heterocigosidad para *dTrabid* inhibió este fenotipo (Fig. 14C, compárese con B), de forma similar a la heterocigosidad para *dTCF* (Fig. 14D). Además, la heterocigosidad para *dTrabid* también inhibió el fenotipo de ojos rugosos debido a la sobreexpresión de

Armadillo (la β -catenina de *Drosophila*) en cierto grado (Fig. 14F, compárese con E). En contraste, no se observaron interacciones genéticas entre *dTrabid* y los componentes de la señalización del receptor de EGF, una ruta que controla la diferenciación en el ojo de la mosca en desarrollo: por ejemplo, el fenotipo de ojos rugosos debido a la sobreexpresión de *Argos*, un inhibidor de esta ruta, permaneció inalterado en los heterocigotos de *dTrabid* (Fig. 14G, H), al igual que el debido a la sobreexpresión de *Rhomboid*, un activador de esta ruta. De forma similar, los fenotipos de ojos rugosos debidos a alteraciones de la ruta Notch (heterocigosidad para *Notch*, o sobreexpresión de *Delta*) se vieron también inalterados en los heterocigotos de *dTrabid*. Estos resultados implican que *dTrabid* es un regulador positivo de la respuesta *Wingless* en *Drosophila*, de forma coherente con los resultados en líneas celulares humanas. Además, sugieren que *dTrabid* no tiene efectos generalizados en otras rutas de señalización. Así, es una ventaja de la invención que los efectos secundarios de la modulación de *Trabid* sean pocos.

Métodos para el Ejemplo 13:

Plásmidos y anticuerpos

pHM6-HA-*Trabid* y pHM6-HA-*Cezanne* (Evans et al., 2003; Evans et al., 2001) fueron proporcionados amablemente por el Dr. Paul Evans; se crearon mutantes puntuales mediante el uso de QuickChange (Stratagene), y se confirmaron mediante la secuenciación del ADN. Para las construcciones GST-*Trabid*, se clonaron fragmentos de cADN de *Trabid* amplificados mediante PCR entre *EcoRI* y *XhoI* del vector de expresión bacteriano pGEX-6P-1. Los anticuerpos usados fueron los siguientes: α -TCF4, α -TCF3/4 y α -Ubiquitina (Upstate), α - β -catenina y α -FLAG M2 (Sigma), α -Parafibromina (Bethyl Laboratories), α -HA 3F10 (Roche), α -LEF1 y α -TLE (Santa Cruz), α -tubulina (Abcam). Se generaron anticuerpos policlonales hacia *Trabid* (Eurogentec) inmunizando ratas con un fragmento N-terminal de *Trabid* (aminoácidos 1-354) fusionado a GST, y se purificaron a partir de las bacterias. El suero de α -*Trabid* de rata en bruto se usó a una dilución 1:100 para las transferencias de Western.

Células, transfecciones y tratamientos

Se mantuvieron células HEK293, HEK293T, SW480 y HCT-116 en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con un 10% de suero bovino fetal. Las moléculas dobles de ARN pequeño de interferencia (siARN, Dharmacon) usadas para seleccionar como objetivo los mARNs de *Trabid* y *Cezanne* son los siguientes (solamente se muestra la cadena codificante): *Trabid* n°1, AGA GGC UUC UUC AAU AAU AdTdT; *Trabid* n°2, AGA GGU GUC UCA ACA AGC AdTdT; *Cezanne* n°1, GAA UCU AUC UGC CUU UGG AdTdT; *Cezanne* n°2, AGA CUU CCG CAG CUU CAU AdTdT. El siARN de control negativo se adquirió de Ambion (N° de Catálogo AM4611). La transfección de moléculas dobles de siARN y ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen Life Technologies).

Ensayos indicadores de NF- κ B y TOPFLASH

Se sembraron células en placas de 12 pocillos a una densidad de $0,8 \times 10^5$ células por ml, y se dejaron adherir a la superficie de la placa durante 12-16 hrs antes de la transfección. Para los experimentos de ARNi, las células se transfectaron primero con siARNs (concentración final 100 nM) y, después de 24 hrs, se re-transfectaron con 250 ng de pTOPFLASH o pFOPFLASH, 20 ng de pRL-CMV (control interno de luciferasa de Renilla) y 1,0 μ g del ADN del plásmido efector, a menos que se especifique de otra manera. Para los ensayos de NF- κ B, las células se transfectaron con un indicador de luciferasa que contenía 4X sitios de unión de NF- κ B (Clontech) y, donde se indique, pEAK12-HA-TNFR2 y pEAK12-I κ B \square DN (S32A, S36A). Las cantidades totales de ADN por transfección se igualaron con un vector vacío. Después de otras 24 hrs, las células se recogieron y se lisaron en tampón de lisis pasiva (Sistema de Ensayo con Indicador de Luciferasa Doble; Promega). La concentración de proteína se determinó con un reactivo basado en Coomassie (Pierce); se usaron 10 μ g de proteína total por muestra (para los ensayos TOPFLASH, o para la transferencia de Western). Para cada ensayo de transcripción, la actividad de luciferasa relativa de las células de control se ajustó arbitrariamente a 1, y los valores de los ensayos experimentales se expresaron como el porcentaje de inducción sobre el control.

Inmunoprecipitaciones y ensayos de arrastre de GST

Las células adherentes se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en tampón de lisis NP40 (tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 120 mM, 1% de NP-40, EDTA 1 mM, Na₃VO₄ 5 mM, NaF 5 mM, 0,5 μ g/ml de aprotinina, 1 μ g/ml de leupeptina) en hielo durante 10 min. Las células se recogieron mediante raspado y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min (4 °C). Se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones mediante el uso de 500 a 700 μ g de extractos de células pre-aclarados con una disolución del 50% de microesferas de Sepharose-proteína G (100 μ L, Zymed), antes de la incubación con 4 μ g del anticuerpo indicado durante 2 h a 4 °C. Los complejos anticuerpo-antígeno se capturaron con 100 μ L de un 50% de microesferas de proteína G durante 1 h a 4 °C. Los ensayos de arrastre de GST se llevaron a cabo con 1 μ g de GST o GST-*Trabid* expresado en bacterias acoplado a una disolución de un 50% de microesferas de glutatión-Sepharose 4B (50 μ L, Amersham) e incubado con 500 a 700 μ g de extractos celulares como se describió anteriormente, o con cadenas de ubiquitina unidas por K63 o K48 (Ub₂₋₇, Affiniti). Las proteínas precipitadas se resolvieron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western. Se prepararon las fracciones nucleares y citoplasmáticas como se describe (Caruccio y Banerjee, 1999).

Ensayos de DUB.

5 Los ensayos se llevaron a cabo como se describe (Wang et al., 2004), con modificaciones. Se incubaron construcciones GST-Trabid (1 µg) con 0,5 µg de cadenas de ubiquitina sintéticas, como se describió anteriormente, en 20 µl de tampón (KCl 150 mM, Hepes 50 mM, pH 7,4, DTT 10 mM, 5% de glicerol, 0,01% de Triton X-100) durante 60 min a 37 °C. Las reacciones se finalizaron con tampón de muestras SDS-PAGE 2x, se resolvieron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western. Las proteínas glutatión S-transferasa (GST) y GST-Trabid se expresaron en *Escherichia coli* BL21(DE3) y se purificaron mediante el uso de microesferas de glutatión-Sepharose (Amersham) según las instrucciones del proveedor. La ubiquitina-aldehído se adquirió de Calbiochem.

RT-PCR cuantitativa en tiempo real

10 Se cultivaron células 293 en placas de 12 pocillos, se transfectaron con siARNs y, después de 24 hrs, se incubaron con medio acondicionado con Wnt3A (de células L de ratón que expresaban de manera estable Wnt3A) o medio de control (de células L de ratón) durante otras 6 hrs. Las células se recogieron en PBS helado y se usaron directamente para la síntesis de cADN con el equipo Superscript III siguiendo las instrucciones (Invitrogen). Las muestras de cADN duplicadas se amplificaron con TaqMan Universal PCR Master Mix y sondas TaqMan TAMRA
15 específicas de gen en un aparato ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). Las curvas patrón se basaron en el gen constitutivo HPRT, cuya expresión no se vio afectada por el tratamiento con W3a-CM. Los resultados se expresan en forma de fracciones de los valores de HPRT.

Cruces de *Drosophila*

20 Se generó una delección de dTrabid (CG9448) mediante recombinación homóloga (Gong y Golic, 2003; Rong y Golic, 2001). Se cruzaron moscas dTrabid/TM3 o de control yw con sev-wg (Brunner et al., 1997), GMR.GAL4 > UAS.Armadillo (Freeman y Bienz, 2001; Greaves et al., 1999), y se dejaron crecer a 25 °C. Los ojos de la progenie heterocigota resultante se puntuaron como se describe (Freeman y Bienz, 2001). Se usó el alelo dTCF³ fuerte (van de Wetering et al., 1997).

25 Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y composiciones descritos en la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito con respecto a realizaciones preferidas específicas, se debería entender que la invención tal como se reivindica no se debería limitar excesivamente a tales realizaciones específicas. De hecho, las diversas modificaciones de los modos descritos de llevar a cabo la invención que son evidentes para los expertos en bioquímica y biotecnología o los campos relacionados pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones
30 siguientes.

Listado de Secuencias Informal

siARN (Nº 1) para Trabid

AGA GGT GTC TCA ACA AGC A

siARN (Nº 2) para Trabid

5 AGA GGC TTC TTC AAT AAT A

siARN Trabid nº 1, AGA GGC UUC UUC AAU AAU AdTdT;

siARN Trabid nº 2, AGA GGU GUC UCA ACA AGC AdTdT;

siARN Cezanne nº 1, GAA UCU AUC UGC CUU UGG AdTdT;

siARN Cezanne nº 2, AGA CUU CCG CAG CUU CAU AdTdT

10

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para reducir la transcripción de TCF, y dicho método comprende reducir la actividad de Trabid.
- 5 2. Un método según la reivindicación 1, en el que la actividad de Trabid se reduce mediante el uso de siARN hacia Trabid.
3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha transcripción de TCF es una transcripción de TCF estimulada por Dvl, estimulada por Wnt3A, estimulada por LiCl, estimulada por la pérdida o la mutación de APC, estimulada por la activación o la mutación de beta-catenina o estimulada por mβ-TrCp-ΔF.
- 10 4. El uso de Trabid en la desubiquitilación de un polipéptido, en el que Trabid comprende al menos el dominio de tumor ovárico (OTU) C-terminal que comprende al menos los aminoácidos 355 a 708 de Trabid, en el que el uso no da como resultado un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y métodos de diagnóstico puestos en práctica en el cuerpo humano o animal.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que la desubiquitilación comprende la escisión de ubiquitina K63.
6. El uso según la reivindicación 4, en el que Trabid comprende además los motivos de dedos NZF N-terminales.
- 15 7. El uso según la reivindicación 4, en el que Trabid comprende los aminoácidos 1 a 708 del polipéptido Trabid humano de longitud completa.
8. El uso de un inhibidor de Trabid para la fabricación de un medicamento para el cáncer colorrectal, en el que dicho inhibidor de Trabid es siARN hacia Trabid o es Trabid C443S.
- 20 9. El uso de un inhibidor de Trabid para la fabricación de un medicamento para la poliposis adenomatosa familiar, en el que dicho inhibidor de Trabid es siARN hacia Trabid o es Trabid C443S.
10. Un inhibidor de Trabid para el uso en el tratamiento del cáncer colorrectal, en el que dicho inhibidor de Trabid es siARN hacia Trabid o es Trabid C443S.
11. Un inhibidor de Trabid para el uso en el tratamiento de la poliposis adenomatosa familiar, en el que dicho inhibidor de Trabid es siARN hacia Trabid o es Trabid C443S.
- 25 12. El uso de Trabid en la precipitación de un polipéptido que comprende ubiquitina.
13. Un método para la identificación de un modulador de Trabid, y dicho método comprende
 - (i) proporcionar un sustrato de Trabid que comprende un resto detectable acoplado a un resto marcador mediante ubiquitina
 - (ii) inmovilizar la primera y segunda porciones de dicho sustrato
 - 30 (iii) añadir un modulador candidato a dicha primera porción
 - (iv) poner en contacto dichas primera y segunda porciones con Trabid
 - (v) incubar para permitir la acción de Trabid, y
 - (vi) ensayar la escisión de la ubiquitina mediante la separación del marcador del resto detectable,
 en el que la separación de una cantidad de resto detectable de dicha primera porción que es diferente de la cantidad de resto detectable separada de dicha segunda porción identifica a dicho candidato como un modulador de Trabid.
- 35

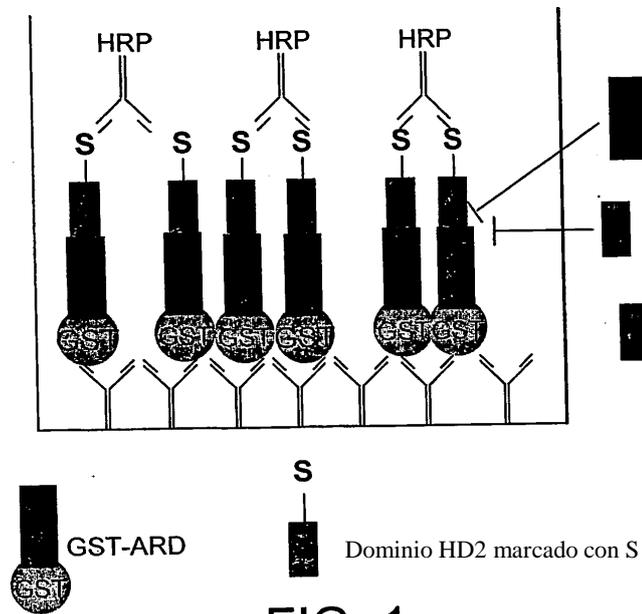


FIG. 1

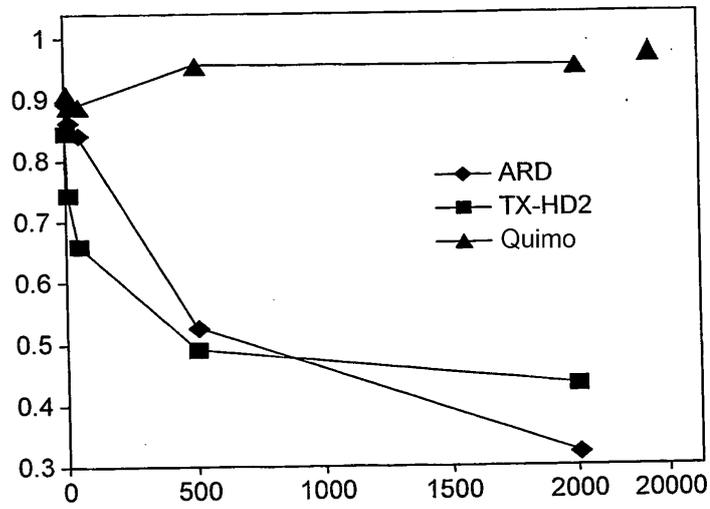


FIG. 2

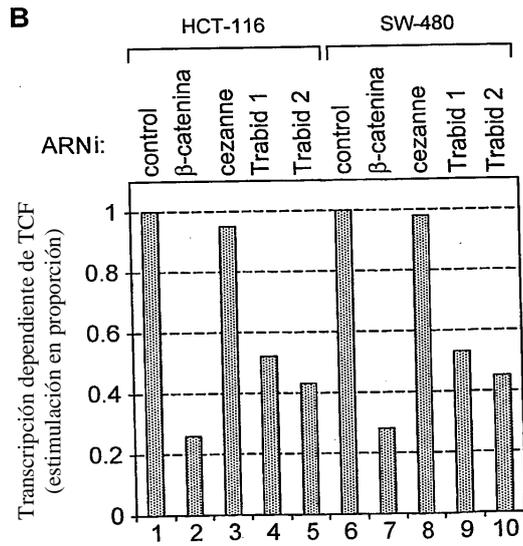
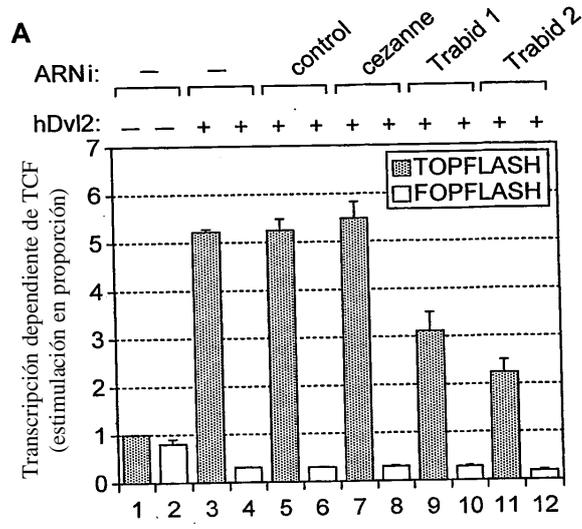


FIG. 3

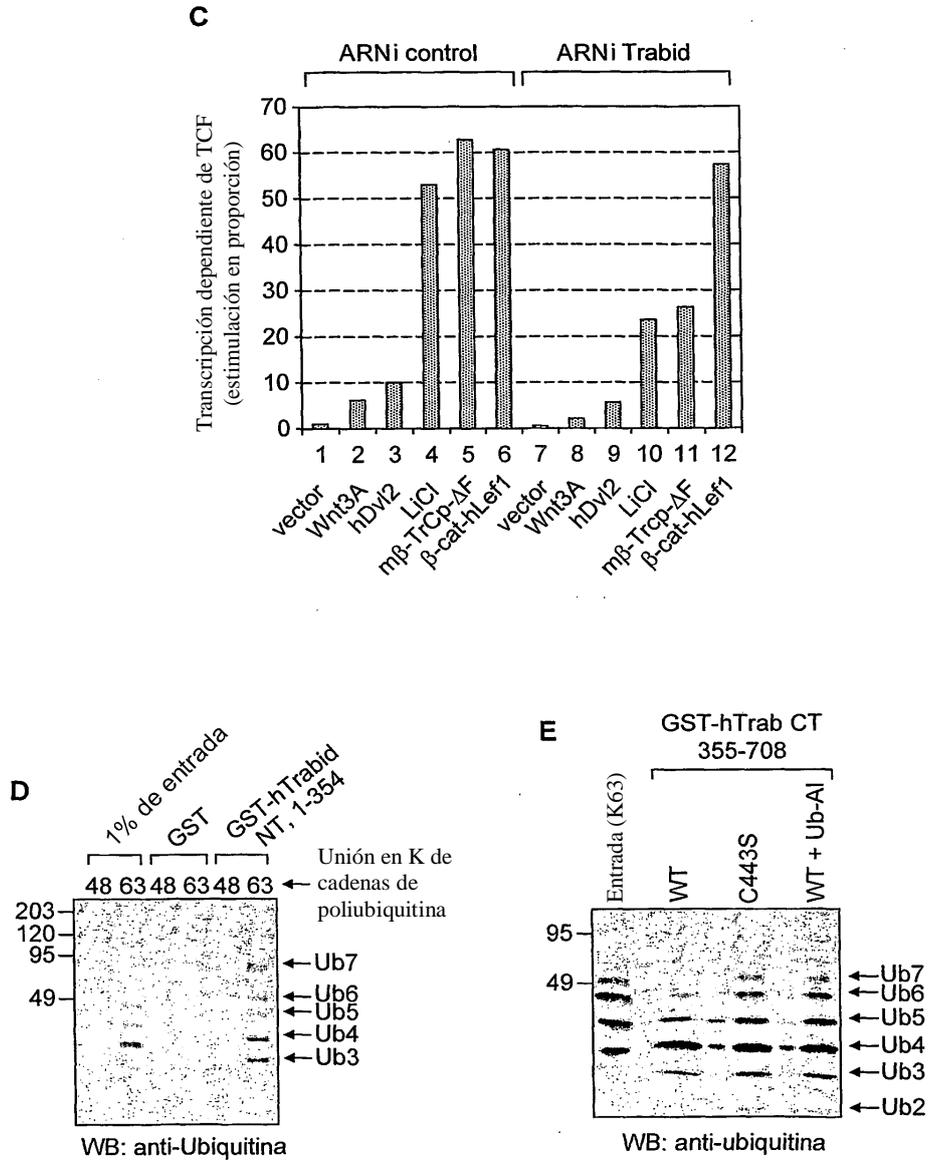


FIG. 3 CONT.

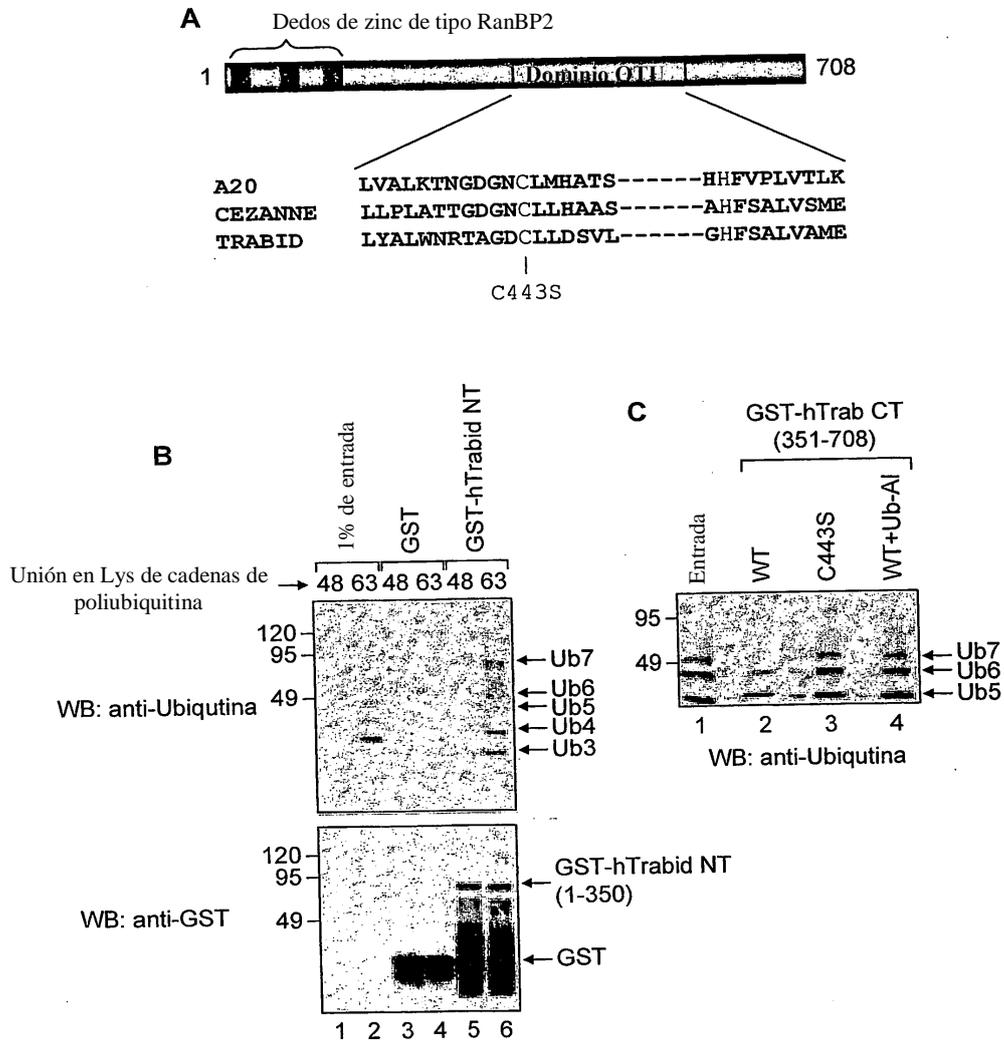


FIG. 4

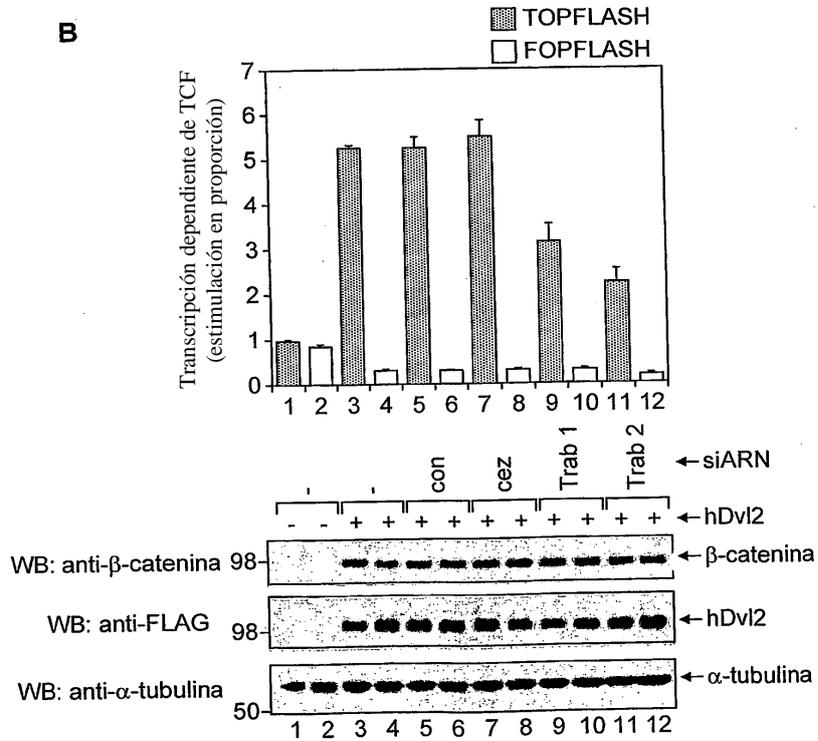
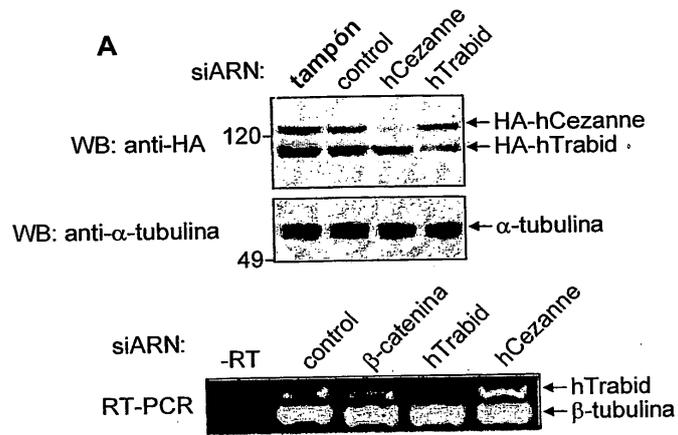


FIG. 5

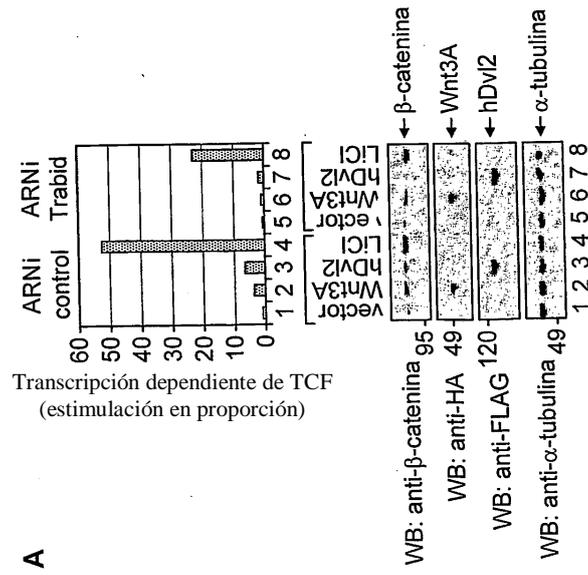
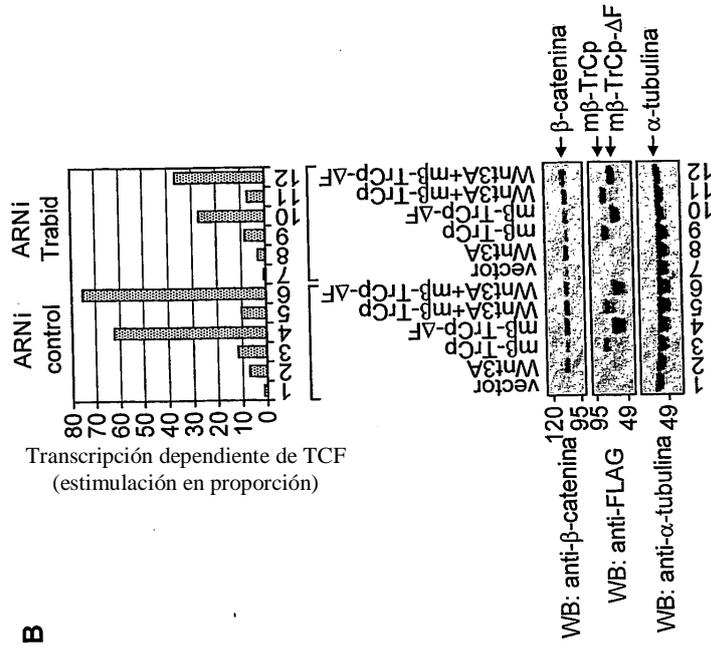


FIG. 6

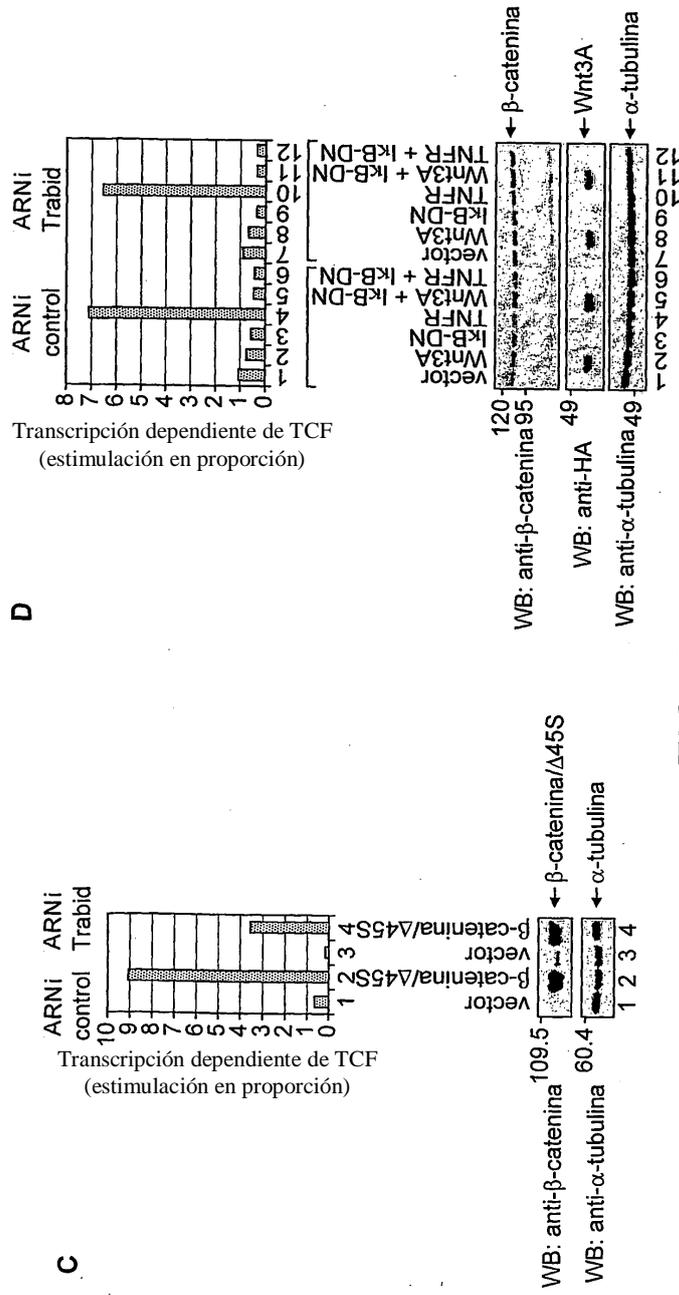


FIG. 6 CONT.

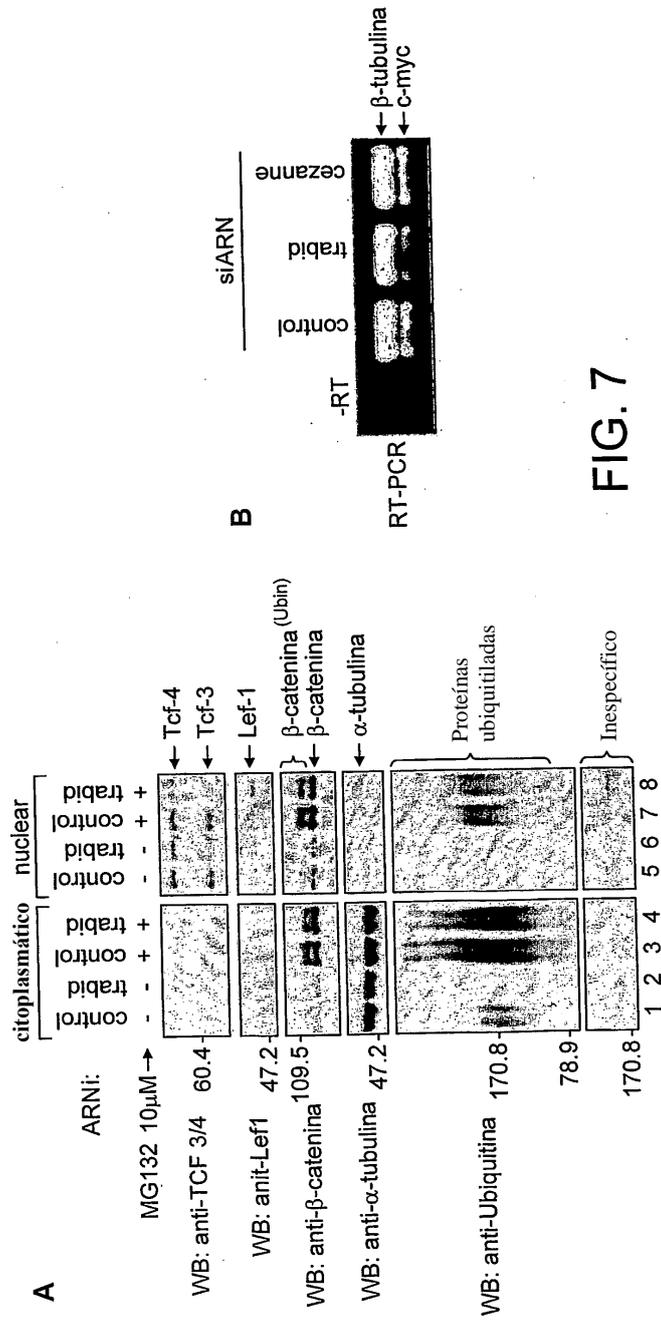


FIG. 7

Dedos de zinc
de tipo ZNF

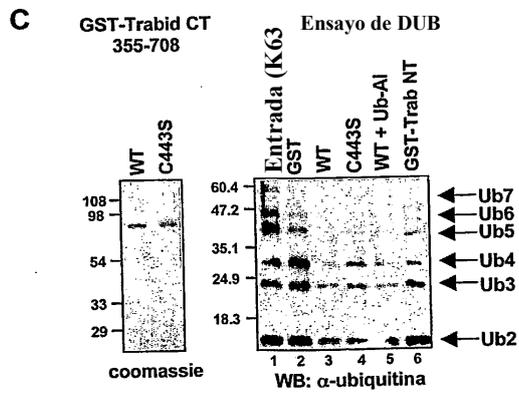
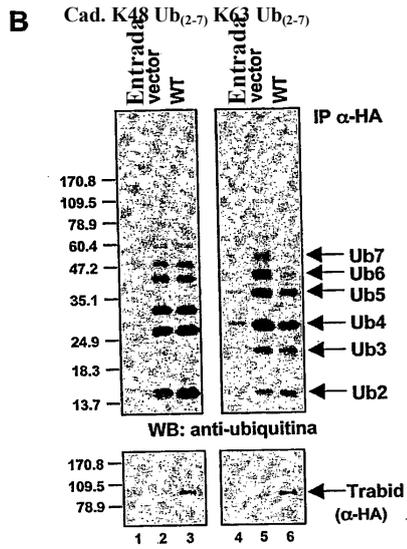
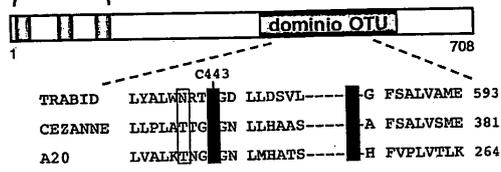


FIG. 8

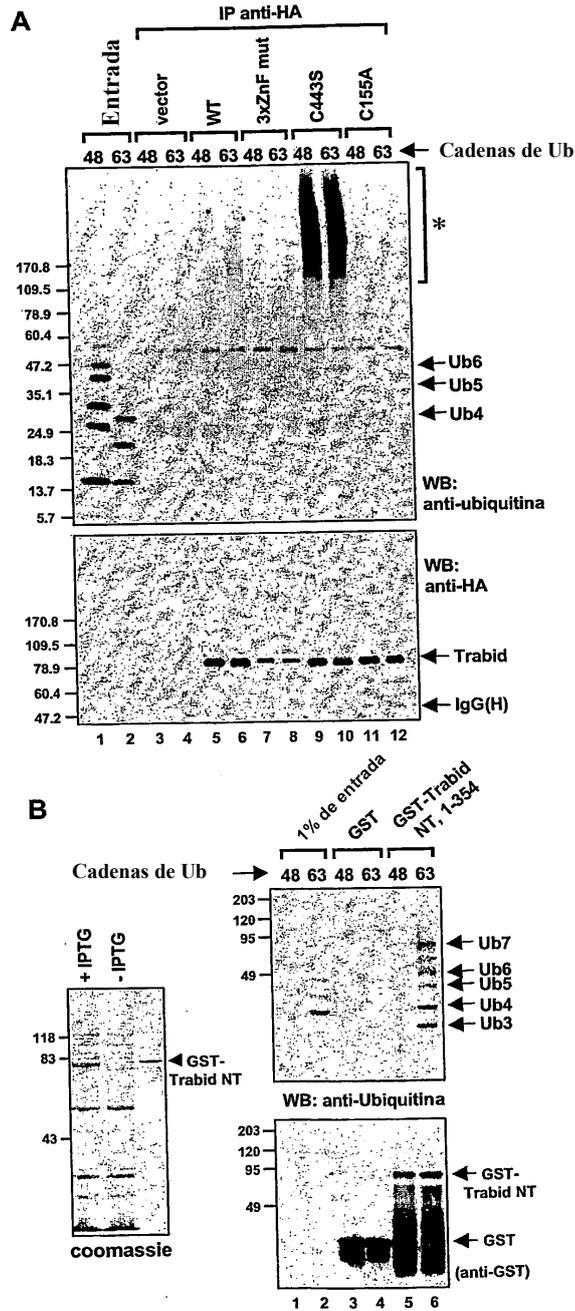


FIG. 9

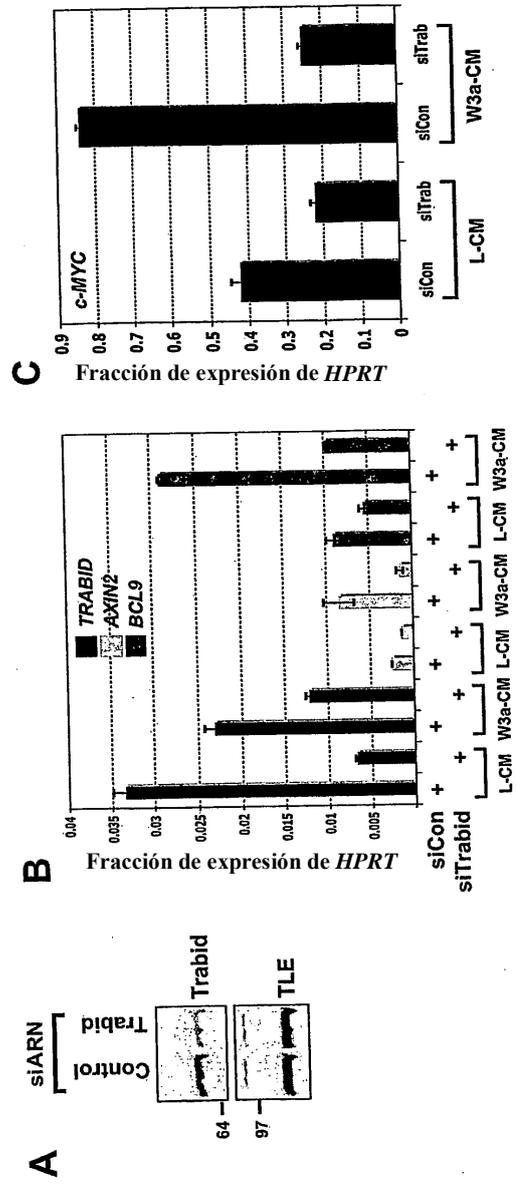


FIG. 10

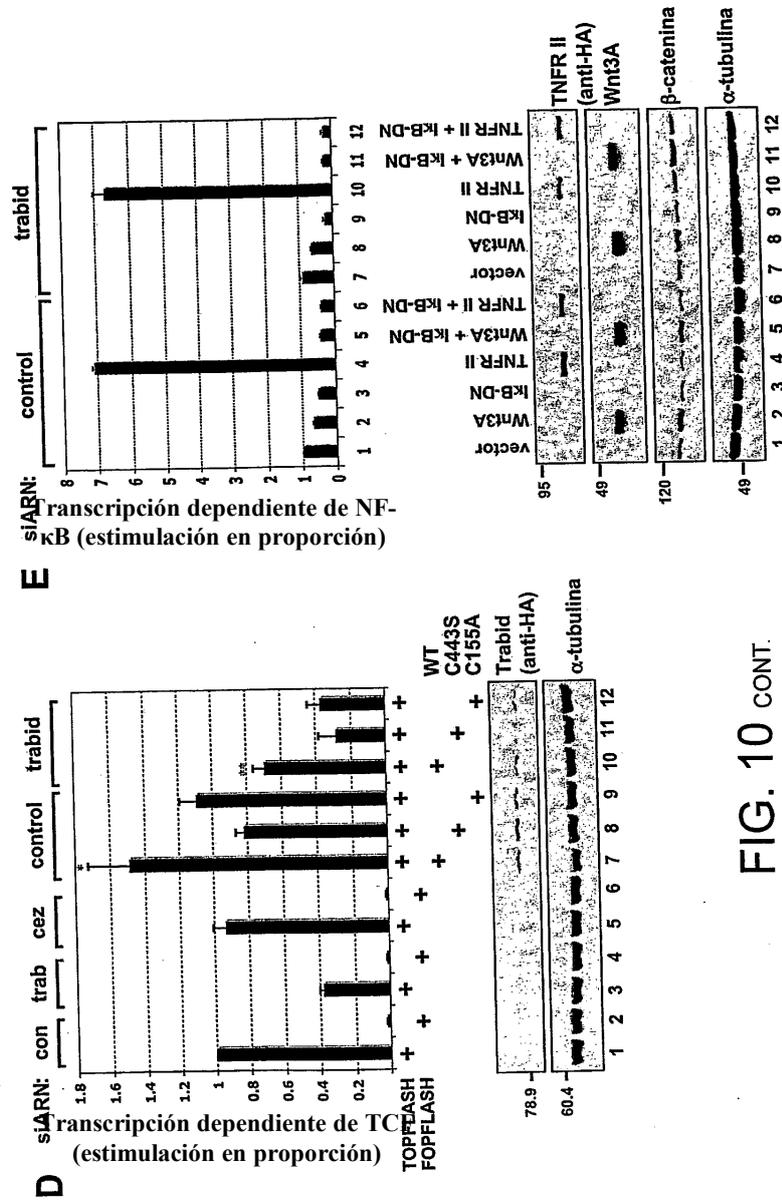


FIG. 10 CONT.

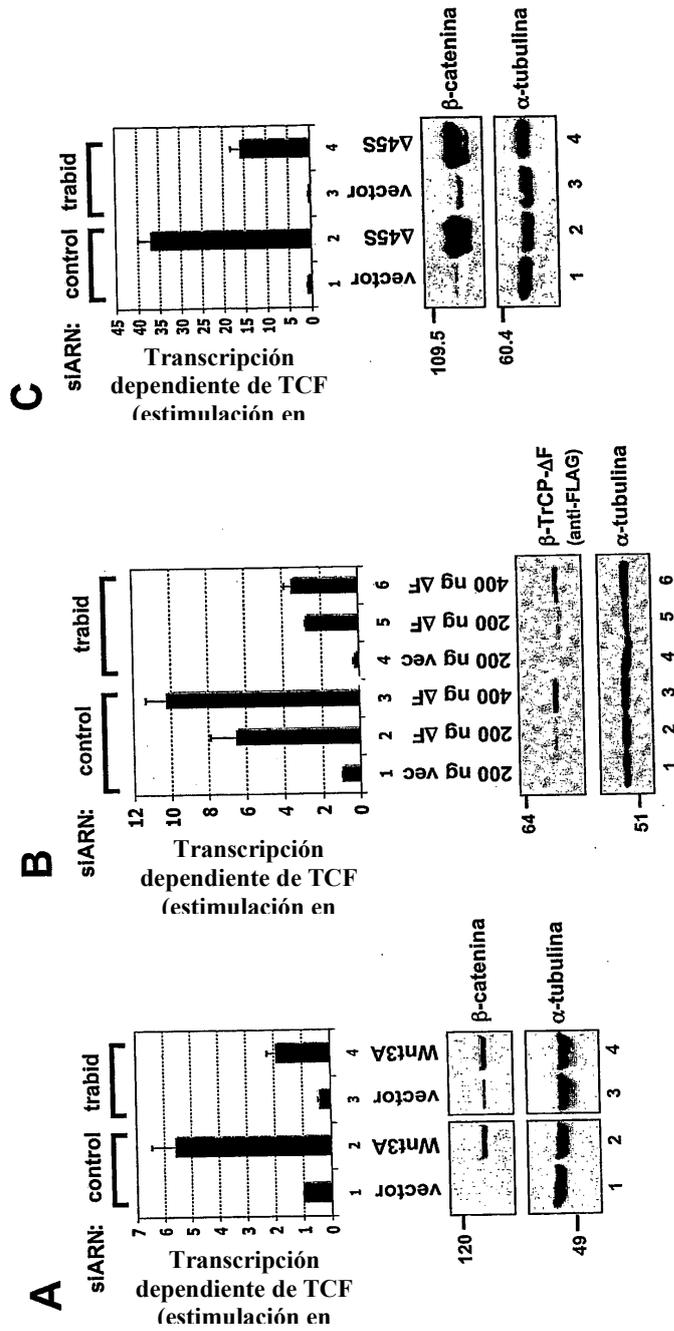


FIG. 11

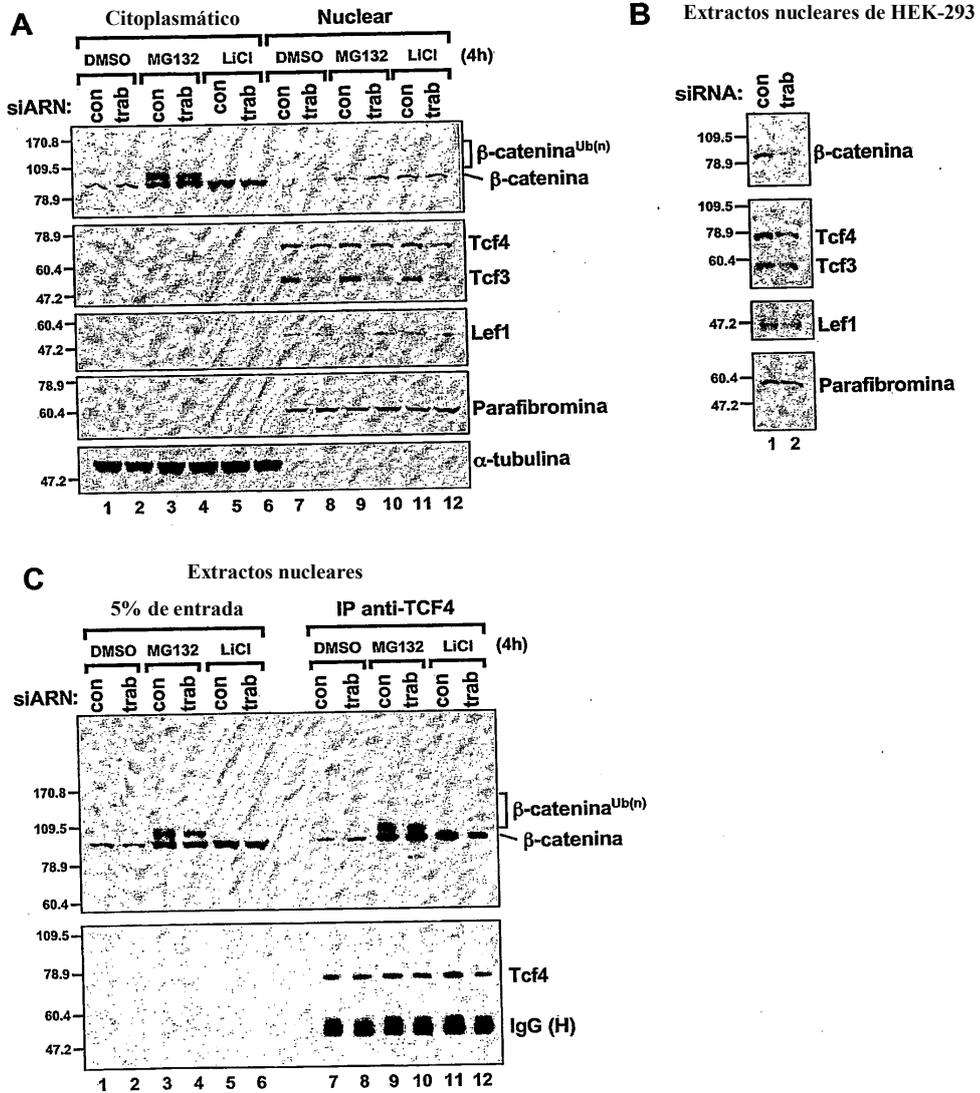


FIG. 12

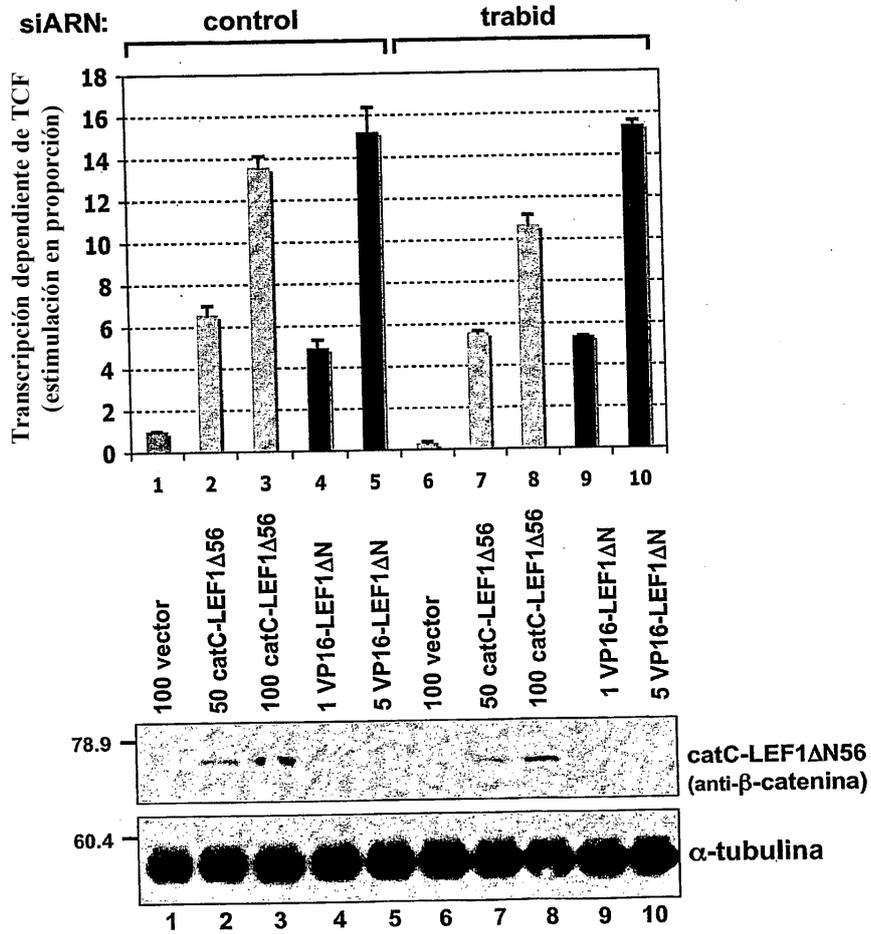


FIG. 13

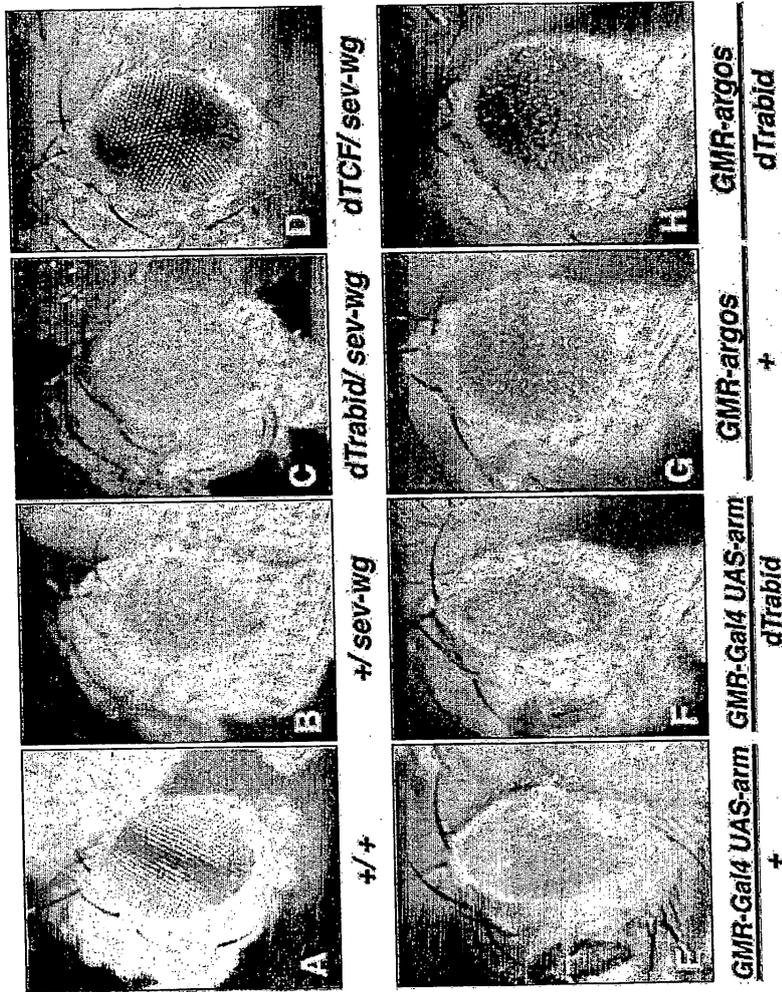


FIG. 14

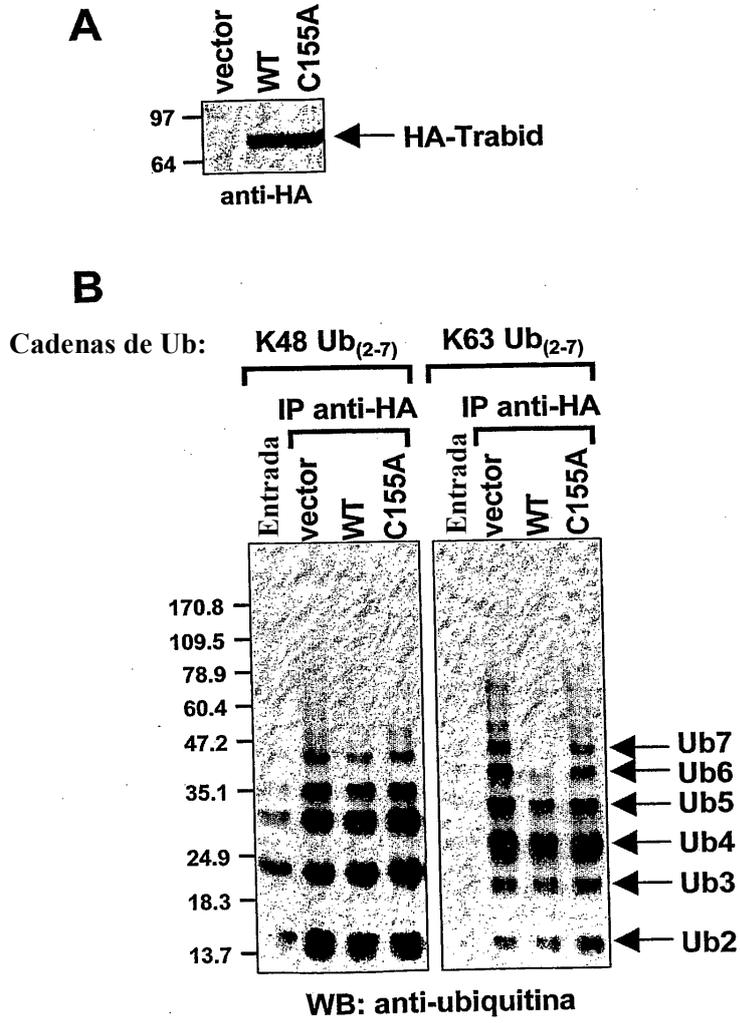


FIG. 15



Dedos de zinc relacionados con Npl4 (NZF)

hTrabid Zn1	G I K W A C E Y C I T Y E N W P S A I K C T M C R A Q R	31
hTrabid Zn2	A N K W S C H M C T Y L N W P R A I R C T Q C L S Q R	111
hTrabid Zn3	T Q H W I C S V C I T Y E N W A K A K R C V V C D H P R	176
hTAB2	G A Q F N C T A C I T F L N H P A L I R C E Q C E M P R	691
hTAB3	G A P F N C D S C I T F L N H P A L N R C E Q C E M P R	710
Npl4 Rata	S A M W T A C Q H C E F M N Q P G T G H C E M C S L P R	30

signatura para la unión de ubiquitina: T₁₀ Y/F Φ₂₂ (flechas)

FIG. 16

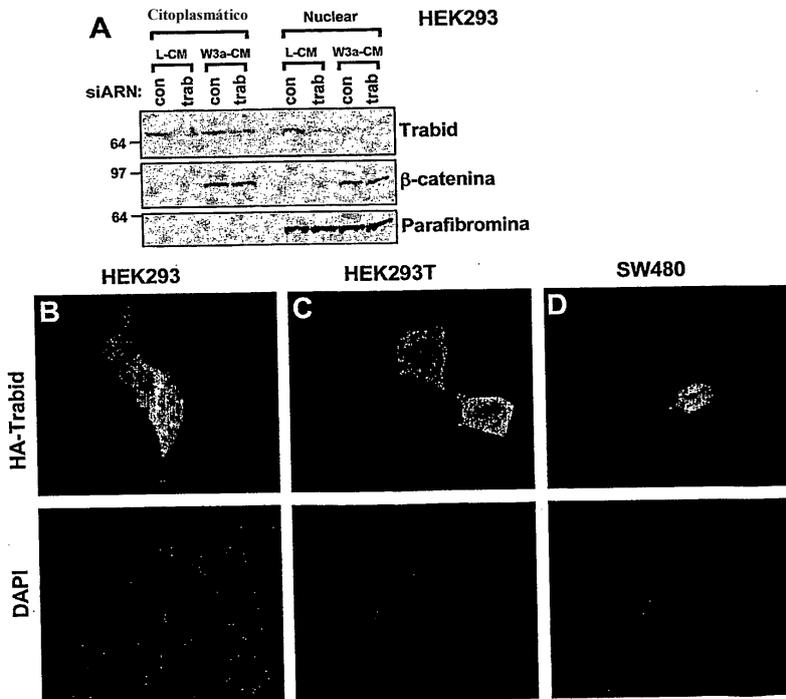


FIG. 17

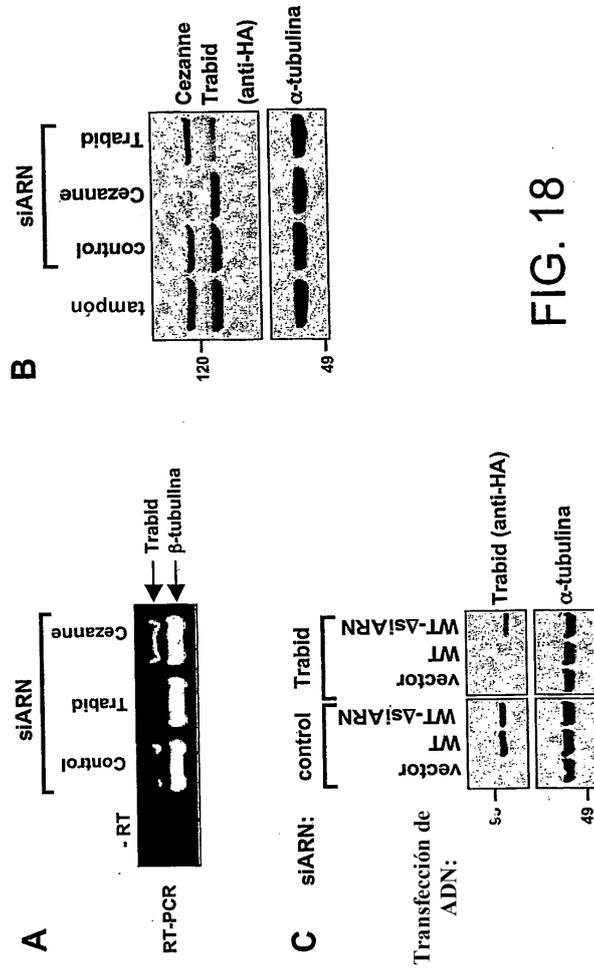


FIG. 18

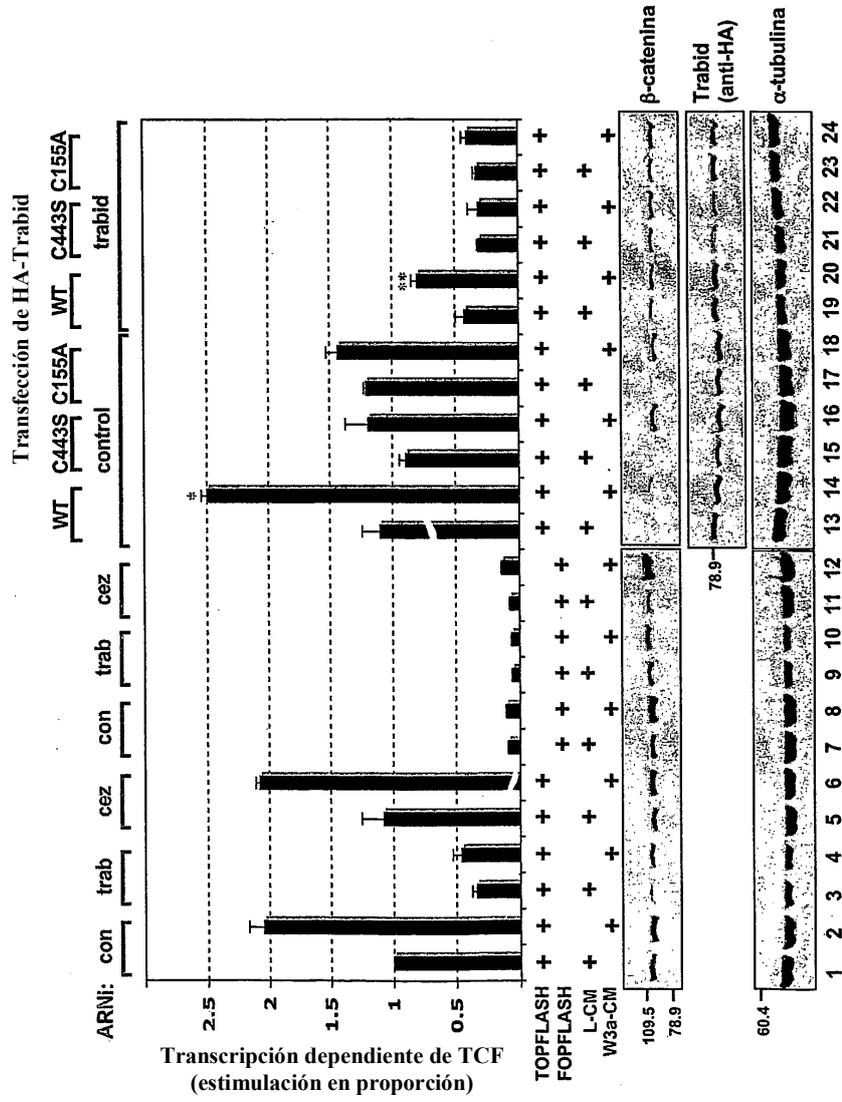


FIG. 19

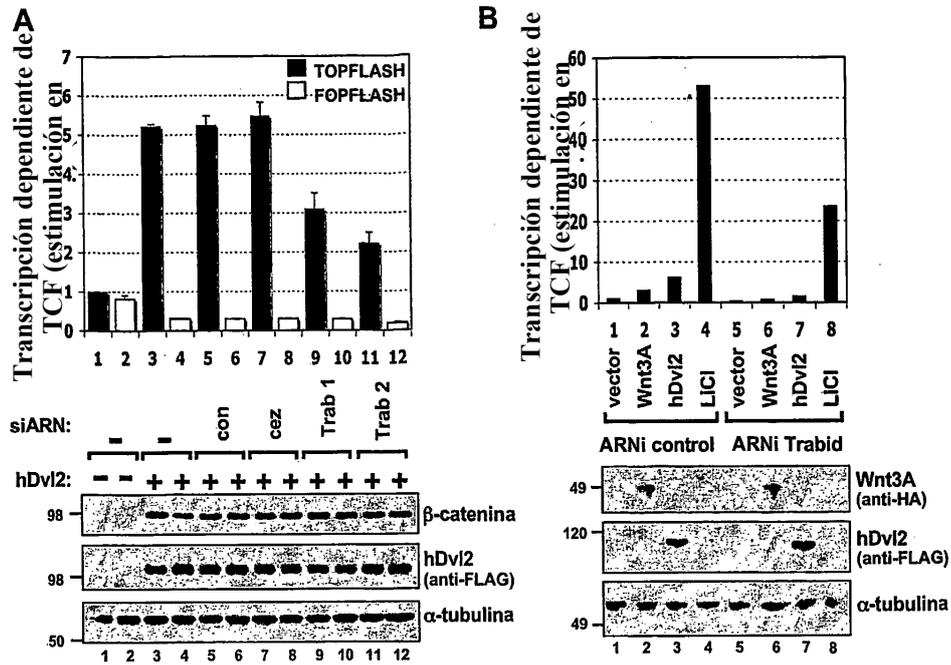


FIG. 20

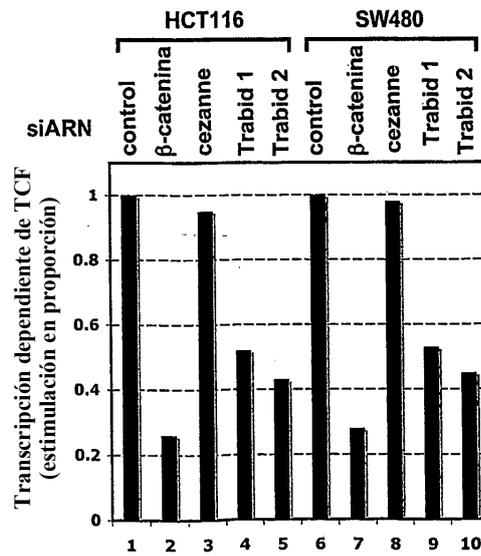


FIG. 21