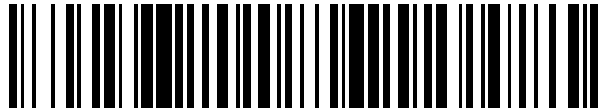


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 356**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2011 E 11729135 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2580344**

54 Título: **Sustrato de diubiquitina marcada con fluorescencia para un ensayo de desubiquitinasas**

30 Prioridad:

14.06.2010 GB 201009941

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

22.12.2014

73 Titular/es:

**MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)
Polaris House, North Star Avenue
Swindon SN2 1UH , GB**

72 Inventor/es:

**KOMANDER, DAVID y
YE, YU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 525 356 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

Sustrato de diubiquitina marcada con fluorescencia para un ensayo de desubiquitininas

La presente invención se refiere a un ensayo para la actividad de desubiquitininas (DUB). En particular, la invención se refiere a un ensayo que usa un sustrato natural para la actividad DUB, que comprende una construcción de diubiquitina marcada que se escinde por la enzima DUB. La invención se refiere también a métodos para preparar tales construcciones, y técnicas que hacen uso del ensayo.

La ubiquitinación de proteínas es una modificación postraducciona versátil con funciones en la degradación proteica, señalización celular, tráfico intracelular y respuesta al daño del ADN (Chen and Sun, *Mol Cell* 33 (3), 275-286, 2009; Komander, *Biochem Soc Trans* 37 (Pt 5), 937-953, 2009). Los polímeros de ubiquitina están unidos a través de uno de siete residuos internos de lisina (K) o a través del grupo amino N-terminal. Es importante que el tipo de enlace de la ubiquitina determina el resultado funcional de la modificación (Komander, 2009). Los polímeros de ubiquitina mejor estudiados, cadenas enlazadas a través de K48 y K63, tienen funciones degradativas y no degradativas respectivamente (Chen and Sun, 2009; Hershko and Ciechanover, *Annu Rev Biochem* 67, 425-479, 1998). Sin embargo, datos recientes han revelado una gran abundancia inesperada de las llamadas cadenas atípicas de ubiquitina; por ejemplo, se ha descubierto que los enlaces-K11 son tan abundantes como los enlaces-K48 en *S. cerevisiae* (Peng et al., *Nat Biotechnol* 21 (8), 921-926, 2003; Xu et al., *Cell* 137 (1), 133-145, 2009).

Las cadenas de poli(ubiquitina) se ensamblan sobre sustratos a través de la acción concertada de una cascada enzimática de tres pasos, que implica una enzima E1 activadora de ubiquitina, una enzima E2 de conjugación de ubiquitina, y ligasas E3 de ubiquitina. Aunque las ligasas E3 fijan las cadenas de poli(ubiquitina) en una diana y por tanto confieren especificidad de sustrato, se cree que las enzimas E2 determinan el tipo de enlace catenario en las cadenas de poli(ubiquitina). Se han identificado enzimas E2 específicas de K48 y K63 (Chen and Pickart, *J Biol Chem* 265, 21835-42, 1990; Hofmann and Pickart, *Cell* 96, 645-53, 1999), lo que ha permitido el análisis estructural de estos tipos de cadenas así como un conocimiento detallado de la especificidad de dominios de unión a ubiquitina y de desubiquitininas (DUBs) (revisado en Komander, 2009). Se han diseñado enzimas específicas de K11, y se describen en nuestra solicitud de patente de UK, en tramitación con la presente, 1007704.8; ver también Bremm et al., *Nature Struct Mol Biol.* 2010, Aug 17(8), 939-47. Además, polímeros de ubiquitina lineales enlazados por extremos N-terminales se pueden sintetizar enzimáticamente a través del complejo LUBAC (Kirisako et al, *EMBO J* 25(20):4877-87, 2006), o por técnicas de biología molecular.

Se conocen en la técnica ensayos para la actividad DUB, que pueden seguir la actividad DUB in vitro. Estos ensayos se compendian en Shanmugham and Ovaa, *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* (2008) 11(5), 688-696. El ensayo usado más comúnmente se basa en el sustrato sintético ubiquitin-7-amido-4-metilcumarina (Ub-AMC), que es aceptado por una variedad de enzimas DUB. Sin embargo, en común con otros sustratos sintéticos conocidos, Ub-AMC comprende una sola molécula de ubiquitina que ha sido marcada; el marcador se libera tras la escisión por DUB. Por tanto, la escisión no es de un enlace isopeptídico entre dos restos de ubiquitina como ocurre en un sustrato natural. La molécula de AMC liberada es fluorescente, y su velocidad de liberación se puede medir y relacionar con la actividad DUB (Dang et al, *Biochemistry* Feb 17;37(7):1868-79, 1998).

El documento US2007292907 describe composiciones y métodos para regular proteasas de procesamiento específicas de ubiquitina usando sustratos de poli(ubiquitina) marcados con fluorescencia.

Por tanto sigue habiendo en la técnica una necesidad de un ensayo de enzimas DUB, que mida la escisión de un enlace de ubiquitina natural. Convenientemente, un ensayo de este tipo permitiría el uso de dímeros de ubiquitina con enlaces particulares, para reflejar mejor la especificidad de unión en enzimas DUB.

Compendio de la invención

Hemos descubierto que un ensayo para la actividad de enzimas DUB se puede basar en un sustrato que comprende una molécula de diubiquitina marcada con fluorescencia, en donde la escisión de la molécula de diubiquitina se puede seguir por anisotropía de fluorescencia, denominada también polarización de fluorescencia, o por transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Por tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un sustrato para medir la actividad de una enzima desubiquitinante (DUB), como se define en la reivindicación 1.

La anisotropía de fluorescencia mide el volteo de una molécula fluorescente en disolución, y la velocidad de volteo depende del tamaño (peso molecular) y forma de la molécula. Tras la excitación de un fluoróforo con luz polarizada, el grado de polarización de la luz emitida polarizada está relacionado con la velocidad de volteo de la molécula fluorescente. Si la molécula cambia de tamaño, como cuando una molécula de diubiquitina se escinde por DUB, cambiará la velocidad de volteo; una reducción del tamaño de la molécula por escisión cambiará la velocidad de volteo, y cambiará el grado de polarización de la luz emitida, que se puede medir fácilmente.

El sustrato es una molécula de diubiquitina marcada, como se define en las reivindicaciones. Aunque se prefieren dímeros de ubiquitina, se pueden usar polímeros más largos de ubiquitina, especialmente en relación con enzimas DUB que no escinden dímeros eficazmente. Si se usan polímeros más largos, el marcador se encuentra

preferiblemente en un monómero de ubiquitina terminal; sin embargo, el fluoróforo puede estar situado en cualquier monómero de la molécula de poli(ubiquitina).

Convenientemente se marca el monómero de ubiquitina C-terminal.

5 En una realización adicional, se puede marcar más de un monómero de ubiquitina. Por ejemplo, se pueden marcar dos monómeros usando diferentes colorantes, y se puede monitorizar la emisión FRET resultante. La señal FRET es dependiente de la proximidad de los colorantes, y cambiará si los monómeros se trasladan conjuntamente más cercanos o más separados.

10 El marcador puede ser cualquier marcador fluorescente. Normalmente los marcadores fluorescentes comprenden un fluoróforo, tal como isotiocianato derivados aminorreactivos, como FITC y TRITC (derivados de fluoresceína y rodamina), succinimidil-ésteres aminorreactivos tales como NHS-fluoresceína, fluoróforos activados por maleimida reactivos de grupos sulfhidrilo, tales como fluorescein-5-maleimida, y fluoróforos disponibles comercialmente tales como los colorantes Alexa (Invitrogen).

15 Tales compuestos se pueden usar para marcar una molécula de ubiquitina, opcionalmente mediante la unión a través de una etiqueta polipeptídica unida a la propia ubiquitina. Por ejemplo, las etiquetas que contienen uno o más residuos de cisteína se pueden marcar de varias maneras. Se conocen en la técnica marcadores fluorescentes biarsenicales, y son útiles en la presente invención. Convenientemente se utiliza el sistema de marcado fluorescente con etiqueta FIAsh, disponible de Invitrogen. El péptido (X)CCXXCC sustituye a los aminoácidos C-terminales de la ubiquitina a marcar, y se usó el reactivo Lumio Green (Invitrogen) para marcar la molécula a través de la interacción con los cuatro residuos de cisteína. Por ejemplo, se puede usar el péptido WCCPGCC.

20 Los 5 últimos aminoácidos (R⁷²LRGG⁷⁶) del extremo C-terminal de la ubiquitina se sustituyen con la secuencia anterior, WCCPGCC. Se sustituye Gly76 de la cola C-terminal de la Ub con el fin de evitar que las DUBs escindan la etiqueta fluorescente de la molécula de ubiquitina. Es admisible una supresión más corta del extremo C-terminal de la ubiquitina siempre y cuando se elimine la Gly76. Tal sustitución C-terminal se puede hacer solamente en la ubiquitina proximal. Sin embargo, ambas ubiquitinas distal y proximal se pueden marcar en sus extremos N-terminales.

25 La adición de un residuo de Trp en la etiqueta FIAsh tiene ventajas adicionales que permiten la cuantificación más exacta de la diubiquitina midiendo la absorbancia a 280 nm. La ubiquitina no contiene residuos de Trp y por tanto es un reto medir su concentración con exactitud. Sin embargo, para medidas cinéticas se necesita determinar con exactitud las concentraciones de sustrato y la adición de un residuo de Trp permite esto.

30 Una etiqueta puede comprender también un solo residuo de Cys para marcar con fluoróforos Alexa. La ubiquitina no contiene residuos de Cys, y por tanto la incorporación de un residuo de Cys permite el marcado específico del sitio. El residuo de Cys puede ser anterior al extremo N-terminal de la ubiquitina. Para generar un marcador estable en el extremo C-terminal de la Ub, el residuo de Gly C-terminal ha de ser mutado o eliminado, ya que de lo contrario el marcador sería liberado por la DUB. El residuo Gly76 C-terminal se puede mutar a Cys para incorporar un marcador en el extremo C-terminal de la ubiquitina.

35 Se pueden usar también fluoróforos polipeptídicos, tales como la proteína fluorescente verde, proteína fluorescente amarilla o proteína fluorescente roja; sin embargo, su mayor tamaño puede reducir la sensibilidad del ensayo de anisotropía.

40 La técnica de anisotropía de polarización usada en este aspecto de la presente invención tiene varias ventajas. Usa solo un único marcador, lo que facilita en gran medida la preparación de reactivos para los ensayos, y mide la escisión del enlace isopeptídico ubiquitina-ubiquitina natural. Este ensayo proporciona una mejor aproximación a la actividad DUB natural que los métodos de la técnica anterior, y mejora la medida de cinética enzimática para la reacción de desubiquitinación.

45 Se puede preparar diubiquitina marcada con fluorescencia mediante el marcado con fluorescencia de una molécula de ubiquitina que se ha generado, ya sea enzimáticamente por ejemplo mediante tratamiento con una enzima adecuada E1 y E2, o por medio de ligación química isopeptídica (ver nuestra solicitud de patente de UK, en tramitación con la presente, No 1007704.8). La unión entre los monómeros de ubiquitina es convenientemente un enlace a través de K63, K48, K11 o lineal, lo que significa que el extremo C-terminal de un monómero de ubiquitina está enlazado al residuo K63, K48, K11 o Met1 de otro monómero de ubiquitina. Otros posibles enlaces incluyen enlaces a través de K6, K27, K29 y K33.

50 En una realización conveniente se puede usar un trímero, tetrámero u otro polímero de ubiquitina. Esto es conveniente cuando, por ejemplo, la DUB a ensayar es inhibida por dímeros de ubiquitina.

55 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para ensayar la actividad de una enzima desubiquitinante (DUB) que comprende la exposición de un sustrato, según el primer aspecto de la invención, a una DUB, y el seguimiento de la escisión del sustrato midiendo la anisotropía de polarización fluorescente o FRET.

En una realización el método utiliza un sustrato en donde se marca un solo monómero de ubiquitina, y se realiza una medida de la anisotropía de polarización fluorescente para detectar la escisión del sustrato.

En una segunda realización el método utiliza un sustrato en el que se marcan dos monómeros de ubiquitina, y la escisión del sustrato se detecta por cambios en la FRET.

5 Preferiblemente, se ensaya la cinética enzimática de la DUB. La DUB puede ser una DUB conocida, o una DUB candidata. El método es adecuado para identificar las actividades de nuevas DUB. Un análisis cinético para una DUB tarda solamente 30 a 60 minutos, y se pueden obtener parámetros cinéticos para una DUB, por ejemplo parámetros de Michaelis Menten (K_m) y velocidades catalíticas (k_{cat}).

10 Si se incluye un segundo sustrato en el ensayo, se pueden usar diferencias en la velocidad de escisión del primer sustrato para evaluar la especificidad relativa de la DUB para dos sustratos diferentes.

Si se marca un segundo sustrato con un fluoróforo diferente que es excitado a una longitud de onda diferente, se puede realizar un experimento de competición directa frente a sustratos. Tal situación refleja la situación in vivo, en donde muchos enlaces pueden estar presentes, incluso con un mayor grado de fidelidad.

15 En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para ensayar uno o más candidatos inhibidores de la actividad DUB. Midiendo los parámetros cinéticos de la reacción de DUB sobre el sustrato de diubiquitina del primer aspecto, se puede obtener la constante de Michaelis (K_m) de un sustrato para cualquier DUB específica. Por tanto se puede medir la influencia de uno o más inhibidores de la reacción enzimática, ya sea afectando a la unión de la DUB al sustrato (cambiando la K_m), o afectando a la actividad catalítica (cambiando la k_{cat}). Esto proporciona una técnica de alto rendimiento para medir la actividad de candidatos inhibidores de DUB, por ejemplo en placas de ensayo multipocillo. En la técnica anterior se han descrito ensayos para inhibidores de DUB, por ejemplo en Shanmugham and Ova, Curr. Opin. Drug Disc. Dev. (2008) 11(5), 688-696; un ensayo de acuerdo con la presente invención, aunque configurable de una manera similar, tiene numerosas ventajas sobre los métodos establecidos en la técnica, por las razones dadas anteriormente.

20

25 En una realización adicional de este aspecto de la invención, se pueden determinar las constantes de unión de una molécula de diubiquitina a una DUB en la que la actividad catalítica se ha suprimido, por ejemplo por mutación de residuos del sitio catalítico. La constante de unión K_d puede estar directamente relacionada con la constante de Michaelis K_m . En esta realización se pueden identificar inhibidores que no son dependientes de los residuos de Cys catalíticos, incluyendo inhibidores alostéricos tales como inhibidores que afectan a la K_d de DUB al sustrato. Tales inhibidores inhiben la unión de la DUB a la diUb marcada. La unión de DUB a la diUb marcada es responsable del aumento observado de la anisotropía, que estará ausente o se reducirá en presencia de un inhibidor. El ensayo de la presente invención es, por tanto, compatible con cribado de alto rendimiento.

30

Hemos determinado que este aspecto de la invención se puede practicar con FRET entre dos fluoróforos situados en cada resto de una diUb marcada, así como anisotropía de polarización fluorescente. Al unirse a sus sustratos, las enzimas DUB abren la conformación de la molécula de diubiquitina antes de la escisión. Por tanto, la unión de una DUB inactiva a un dímero de ubiquitina provoca un cambio en la FRET porque los fluoróforos se mueven más separados.

35

En un cuarto aspecto de la invención, se puede usar el ensayo de la invención para identificar y caracterizar los dominios de unión a ubiquitina (UBDs). Por ejemplo, se pueden cribar lisados celulares para la presencia de UBD exponiendo a los lisados diferentes construcciones de diubiquitina marcada y siguiendo los cambios en la actividad de DUB en un ensayo según la invención. Alternativamente, se pueden probar proteínas que contienen UBDs, o UBDs aislados, para la unión a diferentes diubiquitinas marcadas.

40

Además, se puede evaluar la especificidad de los UBDs para cualquier enlace particular de cadenas de Ub, comparando diferentes reactivos de diUb marcada (f-diUb o FRET-diUb, enlazada a través de K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 o Met1) en una determinación paralela de constantes de unión.

45 Por consiguiente, se proporciona un método para ensayar uno o más candidatos inhibidores de la actividad DUB, que comprende las etapas de:

(a) ensayar una DUB según el segundo aspecto de la invención, para establecer una actividad de referencia para la DUB;

50 (b) ensayar una DUB según la etapa (a) en presencia de uno o más candidatos inhibidores de la DUB, y seguir cambios cualesquiera en la actividad.

Preferiblemente, la actividad se selecciona de una actividad de unión y una actividad de escisión. Se puede usar la anisotropía de polarización fluorescente o FRET.

Convenientemente la etapa (b) se lleva a cabo en un formato de ensayo múltiple, que permite que se realicen ensayos en paralelo. El ensayo se usa preferiblemente en un entorno de HTS.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: gráficas de anisotropía de polarización que muestran la determinación de la escisión de sustrato, enlazado a través de K63 (UbK63), por la DUB TRABID a diversas concentraciones de sustrato.

5 Figura 2: datos cinéticos calculados a partir de los resultados mostrados en la Fig. 1. El gráfico muestra la confirmación de la constante de especificidad TRABID:(Ub2K63 FIAsH) y determinación de la K_m de TRABID:(Ub2K29) por polarización de fluorescencia.

Figura 3: datos obtenidos con enzima USP21, usando sustratos enlazados a través de K63 y K48.

Figura 4: cinética de Michaelis Menten para USP21, usando moléculas de di-ubiquitina fluorescente obtenidas con enlaces K48, K63 o K11.

10 Figura 5: cinética de Michaelis Menten observada con vOTU DUB, usando enlaces K63 y K48 (A y B); AMSH DUB usando f-diUb enlazada a través de K63 (C); y OTUB1 DUB usando f-diUb enlazada a través de K48 (D).

Figura 6: cinética de Michaelis Menten medida usando Ataxin-3 DUB y f-diUb enlazada a través de K63 (A) o K48 (B).

15 Figura 7: (A) Un diagrama que muestra posibles modos de interacción para di- y triUb (círculos) en USP21 (modelo espacial). (B, C) Gráficas que muestran la unión de USP21WT y USP21EEA (inactiva) a (B) diUb-FIAsH lineal y (C) triUb-FIAsH medida por anisotropía de fluorescencia. Las barras de error representan la s.d (desviación estándar) de la media.

Descripción detallada de la invención

20 A menos que se indique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el habitualmente entendido por los expertos en la técnica, tales como en las técnicas de química de péptidos, cultivo celular y presentación en fagos, química y bioquímica de ácidos nucleicos. Se usan técnicas estándar para biología molecular, métodos genéticos y bioquímicos (ver Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.).

25 Las enzimas DUB, como se denominan en la presente memoria, son enzimas desubiquitinantes o desubiquitininas. In vivo, pueden invertir la acción de las enzimas de conjugación de ubiquitina escindiendo ubiquitina de proteínas diana. Se conocen más de 100 DUBs en el genoma humano, ver Reyes Turcu et al., (2009) *Annual Review of Biochemistry* 78:363-97, Komander et al, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8), 560-563, 2009. Las DUBs son responsables de rescatar a las proteínas de la degradación, reciclaje o remodelado de ramificaciones de ubiquitina, regeneración de ubiquitina libre y la producción de novo de ubiquitina, que se traduce como una proteína de fusión lineal que contiene múltiples copias de ubiquitina. Por tanto, las DUBs regulan muchos procesos que implican ubiquitinación. La mayoría de las DUBs son cistein-proteasas, pero algunas son metaloproteasas, y diversas DUBs han estado implicadas en enfermedades, incluyendo el cáncer y neurodegeneración, y en inmunidad tanto innata como adaptativa.

35 El marcado fluorescente incluye cualquier técnica adecuada para marcar polipéptidos. Por ejemplo, ver la revisión proporcionada en Zhang et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2002) 3:906, y Marks & Nolan, *Nature Methods* (2006) 3:8, 591; Genger et al., *Nature Methods* (2008) 5:9, 763; Giepmans et al., *Science* (2006) 312 (5771): 217-224.

40 Una marca fluorescente preferida es el reactivo marcador enlazante de Horquilla de Fluoresceína Arsenical (FIAsH), EDT₂[4',5'-bis(1,3,2-ditioarsolan-2-il) fluorescein-(1,2-etanodiol)]₂. Este es un compuesto bisarsenical que se une a polipéptidos que comprenden la secuencia C-C-X-X-C-C, en donde "C" representa cisteína y "X" representa cualquier aminoácido distinto de cisteína (Griffin et al. *Science* 281:269-272, 1998). Adams et al. (*Am Chem Soc.* 124:6063-6076, 2002) han descrito que la afinidad más alta se consigue cuando X-X es prolina y glicina. Se han incorporado exitosamente etiquetas FIAsH, ya sea en extremos N- o C-terminales de proteínas, así como regiones superficiales expuestas dentro de una proteína (Griffin et al., 1998; Adams et al., 2002, y Griffin et al. *Methods Enzymol.* 327:565-78, 2000). El colorante bisarsenical se hace reaccionar normalmente con dos moléculas de etilenditio (EDT) para una difusión más fácil a través de la membrana celular. El reactivo marcador FLASH-EDT₂ no es fluorescente y se vuelve fluorescente después de la unión al motivo tetracisteína para la "etiqueta-FLASH". Cuando el colorante FIAsH-EDT₂ no está unido a una proteína, el pequeño tamaño del EDT permite la libre rotación de los átomos de arsénico que extinguen la fluorescencia del resto de fluoresceína. Cuando una proteína marcada con C-C-P-G-C-C se mezcla con el colorante FIAsH-EDT₂, los átomos de arsénico del colorante FIAsH reaccionan con la etiqueta de tetracisteína de la proteína y forman enlaces covalentes. El producto de esta reacción no permite la libre rotación de los átomos de arsénico y, como ya no extinguen su fluorescencia, el resto de fluoresceína se vuelve fluorescente. El aumento de la fluorescencia es aproximadamente 50.000 veces cuando el colorante FIAsH se une a la proteína (Griffin et al., 1988).

Se pueden usar también otros marcadores, tales como colorantes comerciales. Los colorantes Alexa producidos por Invitrogen son ejemplos de colorantes útiles en la práctica de la invención (Panchuk-Voloshina et al., *J Histochem Cytochem* September 1, 1999 vol. 47 no. 9, 1179-1188).

5 Ubiquitina, como se usa en la presente memoria, se refiere a la ubiquitina y proteínas de tipo ubiquitina. En una realización, se refiere a ubiquitina específicamente y excluye otras proteínas de tipo ubiquitina.

El enlace seleccionado en un sustrato según la invención dependerá de la especificidad de la DUB a ensayar. Se conocen en la técnica métodos para preparar polímeros de ubiquitina usando enlaces específicos, por ejemplo en Komander, D., et al., (2008) *Mol. Cell* 29, 451-464; Pickart, C.M. and Raasi, S. (2005) *Methods Enzymol.* 399, 21-36; Trempe, J.F., et al., (2005) *EMBO J.* 24, 3178-3189; y Bremm et al, *Nature Struct Mol Biol.* 2010, Aug; 17(8); 939-47.

10 En los mamíferos hay aproximadamente 100 DUBs categorizadas en cinco familias de genes: ubiquitin C-terminal hidrolasas (UCHs); las peptidasas específicas de ubiquitina (USPs/UBPs); proteínas de dominios tumorales ováricos (OTU); proteínas de la enfermedad de Josephin o Machado-Joseph (MJD) y las proteínas de dominios JAMM (metaloisopeptidasas asociadas a dominios Jab1/MPN). Las cuatro primeras familias son cistein-peptidasas, mientras que las proteínas JAMM son metaloisopeptidasas de cinc. Estas familias de DUBs han sido objeto de recientes revisiones [Amerik & Hochstrasser, *Biochim Biophys Acta* 2004, 1695:189-207; Soboleva & Baker, *Curr Protein Pept Sci* 2004, 5:191-200; Nijman et al., *Cell* 2005, 123:773-786; Reyes Turcu et al., *Annu. Rev. Bioche.* 2009, 78:363-397; Komander et al., *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10(8), 560-563.

20 La mayoría de las DUBs contienen un dominio catalítico, y secuencias no relacionadas, ya sean N-terminales o C-terminales (o ambas), con el dominio catalítico. Se ha demostrado que estas secuencias flanqueantes participan en la unión al sustrato en algunos casos.

25 Puesto que la mayoría de las DUBs se han identificado solamente por medio de similitud de secuencias con motivos catalíticos, hay información funcional limitada sobre muchas de estas enzimas. Sin embargo, los ejemplos en los que se han adquirido conocimientos funcionales indican que las DUBs pueden jugar unos papeles reguladores cruciales en el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), haciéndolas ideales candidatos diana de fármacos para la intervención terapéutica en enfermedades relacionadas con el UPS.

Las DUBs incluyen, pero sin limitarse a ellas, isopeptidasa T, Rpn11/POH1, UCH37, Ubp6/Usp14, Ubp8/Usp22, Ubp10, Usp16/Ubp-M, Usp21, 2A-DUB, Usp28, Usp44, Usp1, Usp11, Usp3, A20, CYLD, Usp15, Usp9Y, Doa4/Usp8, AMSH y Usp9X. Para obtener una lista completa de DUBs descubiertas hasta la fecha, consultar Komander et al., *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2009.

30 Se conoce en la técnica la polarización de fluorescencia. Por ejemplo, ver *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition, Joseph R. Lakowicz, ISBN-13: 978-0387-31278-1, Springer, New York, 2006; Gradinaru et al., *Analyst*, 2010, 135:452-459; y Huang & Aulabaugh, *Methods in Molecular Biology* 565, 2009, 127-143.

Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de la escisión de diUb por OTU DUB TRABID

35 La construcción Ub-W-FIAsh se amplificó por PCR a partir de un plásmido que codifica ubiquitina de tipo natural con cebadores inversos, introduciendo la secuencia de aminoácidos WCCPGCC partiendo del residuo 72 de la secuencia de ubiquitina, sustituyendo por tanto las 5 últimos residuos de la ubiquitina (RLRGG). La ubiquitina no contiene un residuo de Trp, lo que da como resultado baja absorbancia a OD280, complicando las medidas cinéticas, y la incorporación de Trp junto con la secuencia CCXXCC requerida permite la cuantificación exacta de las concentraciones.

40 El producto de PCR se clonó posteriormente en el vector pET17b (disponible de EMD chemicals) usando métodos convencionales. La expresión y purificación de esta construcción de ubiquitina se realizaron de acuerdo con los métodos establecidos (Pickart and Raasi, 2005). El rendimiento global es 10 mg por litro. La ligación de diubiquitina enlazada a través de K63 se realiza usando cantidades equimolares de UbWFIAsH, que solo puede formar el componente de ubiquitina proximal, y UbK63R, que solo puede ser la ubiquitina distal. La metodología para la ligación y purificación posterior de diubiquitina se ha descrito en otra publicación (Komander et al., *EMBO Reports*, 2009). La diubiquitina purificada enlazada a través de K63 se marcó en tampón 1 (2-mercaptoetanol al 0,1%, Tris 50 mM, pH 7,6), con reactivo Lumio Green (Invitrogen) con relación equimolar a temperatura ambiente durante 1 h, seguido por diálisis durante una noche frente a tampón 1 (2-mercaptoetanol al 0,1%, Tris 50 mM, pH 7,6). La concentración de diubiquitina marcada con FIAsh se determinó usando NanoDrop, y el rendimiento del marcado comparando las absorciones calculadas a 280 nm y 480 nm. El rendimiento del marcado fue prácticamente 100%.

50 Las reacciones de hidrólisis se iniciaron mediante la adición de 10 μ L de enzima preactivada en tampón 2 (Tris 50 mM, pH 7,6, NaCl 50 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, TRABID 1 μ M) a 10 μ L de sustrato fluorescente en tampón 3 (Tris 50 mM, pH 7,6, NaCl 50 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, (UbK63 FIAsh)₂ 0,6-20 μ M). Se realizaron tres reacciones en un tiempo en paralelo en una placa de 384 pocillos de bajo volumen #3676 (Corning). La disminución de la anisotropía de fluorescencia se monitorizó inmediatamente después usando un lector de microplacas

5 PHERAstar (BMG Labtech) con un módulo 485/520A/520B FP. Se recogieron datos durante 29 minutos con un intervalo de 7 segundos. Cada concentración de sustrato se preparó por duplicado o triplicado. A continuación el experimento se repitió en presencia de diubiquitina 1 μM enlazada a través de K29 que no fue marcada con fluorescencia y compete en la reacción con la diubiquitina marcada enlazada a través de K63. Las curvas de progreso se ajustaron a una sola función de decaimiento exponencial y la señal de anisotropía se normalizó a una escala de concentración μM . Las velocidades iniciales se determinaron mediante el cálculo de la primera derivada de los datos de progreso ajustados, a $t = 0$. Los valores de velocidad inicial, v_0 , se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, y la cinética se analizó como se describe a continuación.

Caracterización de la cinética de desubiquitinasa

10 Confirmación de la constante de especificidad de TRABID:(UbK63 FIAsh)₂ y determinación de la K_m de TRABID:Ub2K29 mediante polarización de fluorescencia.

15 La velocidad inicial de escisión de (UbK63 FIAsh)₂ se determinó siguiendo la disminución de la anisotropía al mezclar TRABID (500 nM) y concentraciones crecientes de (UbK63 FIAsh)₂ en tampón (Tris 50 mM, pH 7,6, NaCl 50 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM 20 μL , a 25°C). Las velocidades iniciales se representaron gráficamente y los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

en donde v_0 es la velocidad inicial, V_{\max} es la velocidad máxima, $[S]$ es la concentración de sustrato y K_m es la constante de Michaelis.

20 Esto da una k_{cat} de 0,029 ($\pm 0,009$) s^{-1} , una K_m de 17 (± 7) μM . Esta K_m es mucho más alta que la concentración de sustrato (250 nM) obtenida para la Ub2K63 por transferencia de tipo western para determinar una constante de especificidad para la escisión por TRABID, y valida el uso de este enfoque. Los datos dan también una constante de especificidad de $1,7 \times 10^3$ ($\pm 2,0$) $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ que es comparable con la determinada por transferencia de tipo western cuantitativa, $2,5$ ($\pm 0,4$) $\times 10^3 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

25 La K_m de TRABID:Ub2K29 se calculó a partir de las velocidades iniciales de la escisión de (UbK63 FIAsh)₂ en presencia de Ub2K29 1 μM usando la ecuación:

$$v_{0(K63FIAsh)} = \frac{V_{\max(K63FIAsh)} [K63FIAsh]}{1 + \frac{K_m(K63FIAsh)}{[K63FIAsh]} + \frac{K_m(K29)}{[K29]}}$$

30 en donde $v_{0(K63FIAsh)}$ es la velocidad inicial calculada, $V_{\max(K63FIAsh)}$ y $K_m(K63FIAsh)$ son la velocidad máxima y constante de Michaelis determinadas para (Ub2K63 FIAsh), respectivamente, en el experimento directo, $[K63FIAsh]$ es la concentración de (Ub2K63 FIAsh), $[K29]$ es la concentración de Ub2K29 y $K_m(K29)$ es la K_m para TRABID:Ub2K29.

35 Esto da una K_m para TRABID:Ub2K29 de $2 \pm 1,6$ μM . Que es mayor que la concentración de sustrato (250 nM) usada para la escisión de Ub2K29 por TRABID en transferencias de tipo western cuantitativas, lo que valida el uso de este método para determinar la constante de especificidad para escindir Ub2K29 por TRABID. Puesto que la constante de especificidad aparente disminuye a medida que K_m se acerca a la concentración de sustrato, nuestros datos pueden subestimar la constante de especificidad de Ub2K29 aunque reflejen con exactitud la constante de especificidad de UbK63. La preferencia de TRABID 40 veces más por Ub2K29 que por Ub2K63 es, por tanto, conservadora y puede representar una subestimación.

Ejemplo 2

40 Escisión de diUb por diferentes enzimas DUB

Los experimentos descritos en el Ejemplo 1 se repitieron para más DUBs con dominios OTU (OTU viral de CCHFV, OTUB1), una DUB con dominio USP (USP21), una DUB con dominio JAMM/MPN+ (AMSH) y una DUB con dominio Josephin (Ataxin3). Los resultados se muestran en las Figuras 4 a 7.

Estos experimentos muestran no solamente que diferentes tipos de enzimas DUB se pueden analizar por el método de la invención, sino también que sustratos que tienen diferentes especificidades de cadena se pueden generar por metodología convencional y usarse en el ensayo de DUB como se ha descrito.

5 Las moléculas de diubiquitina se generaron con enlaces K48, K63 y K11, y se usaron en un ensayo como se ha descrito en el Ejemplo 1. En cada experimento se puede obtener la cinética de Michaelis Menten para la enzima DUB, como se muestra en las figuras que acompañan.

Ejemplo 3

Reactivos de unión a DUB/UBD

10 Cadenas de diubiquitina fluorescente (f-diUb), como se describe en los Ejemplos 1 y 2, se pueden usar como reactivos de unión para enzimas DUB que han sido inactivadas por mutación (denominadas DUBi). Los residuos de sitio activo de las DUBs están bien establecidos, y en la mayoría de los casos estas enzimas son cistein-proteasas que se pueden inactivar, por ejemplo, por mutación del residuo de Cys catalítico. La DUBi inactiva se une todavía a cadenas de Ub.

15 Usando f-diUb se pueden determinar constantes de unión para DUBi mediante métodos de anisotropía/polarización de fluorescencia. La unión de DUBs a f-diUb conduce a un aumento de la anisotropía, ya que la molécula fluorescente es ahora mucho mayor que antes.

20 Hemos establecido este ensayo en un formato de 384 pocillos, usando cantidades bajas (5 nM) de f-diUb. Examinamos la unión de diferentes cadenas de Ub fluorescentes a USP21i inactivada. Como anteriormente, se sustituyeron cinco residuos de Ub en el extremo C-terminal con una secuencia de etiqueta-FIAsh precedida por Trp (WCCPGCC) que se puede marcar mediante derivados de fluoresceína.

25 Se utilizó un lector de placas PheraStar FS en el ensayo de unión. Se diluyeron a 80 nM en tampón FIAsh (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, β -mercaptoetanol al 0,1%, pH 7,6) cadenas de ubiquitina lineales marcadas con fluorescencia. USP21i de tipo natural o mutante se diluyó en serie en tampón FIAsh al intervalo de concentración indicado (Fig. 7C, D). Se mezclaron 10 μ l de la cadena de Ub fluorescente con igual volumen de USP21i a diferentes concentraciones y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora antes de la medida. La anisotropía de fluorescencia se midió en formato de 384 pocillos utilizando un lector de placas Pherastar FS, usando un módulo de polarización de fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión a 485 nm y 520 nm, respectivamente. Se usó un control para moléculas de di- o triUb lineales en donde se añadieron 10 μ L de tampón FIAsh. Este control se usó también para la normalización de la lectura de anisotropía. Todos los ensayos de unión se realizaron por triplicado.

30 La monoUb marcada con fluorescencia no se une al sitio S1 de USP21i de unión a Ub, supuestamente porque el voluminoso grupo fluorescente no encaja en la ranura del sitio activo. En cambio, una diUb lineal con esta secuencia añadida al resto proximal se puede unir a los sitios S1 y S10 y una triUb lineal se pueden unir a los sitios S2, S1 y S10 de la enzima (Fig. 7A). La triUb lineal podría también interaccionar solamente con los sitios S1/S10, no beneficiándose de un sitio S2 (Fig. 7A). Por tanto, las diferencias entre la unión de di- y triUb reflejan en parte una contribución del sitio de unión S2. Las medidas de anisotropía revelaron una pequeña, pero reproducible, diferencia entre la unión de di- y triUb a USP21i, en la que la triUb se unía con una afinidad 1,4 veces mayor (Fig. 7C, D). En cambio, el mutante USP21IEEA se unía a la triUb con una afinidad 1,5 veces menor, en comparación con la diUb (Fig. 7C, D).

40 Un enfoque similar se usa para medir la unión a dominios de unión a ubiquitina (UBDs). La ubiquitinación de proteínas, que dirige las proteínas al sistema ubiquitina-proteasoma, se basa en la unión de ubiquitina a proteínas por medio de un dominio de unión a ubiquitina (UBD) presente en las proteínas. La anisotropía de fluorescencia de la cadena de diubiquitina aumenta con la unión por un UBD, puesto que el tamaño de la molécula aumenta. En los experimentos descritos anteriormente y en la Fig. 7, USP21i es funcionalmente un UBD.

Ejemplo 4

45 Reactivos FRET; monitorización de la escisión y actividad de unión

Métodos

Clonación

50 Se generaron por PCR construcciones de Ub dadora introduciendo una secuencia de Al-Cys antes de la Met1 N-terminal de Ub. Se usaron mutantes K11R, K48R o K63R de Ub como plantilla para PCR para generar una Ub dadora no extensible (Ala₁Cys₀-UbKxR). El producto de PCR se clonó posteriormente en el vector pOPINS que alberga una etiqueta His₆-SUMO N-terminal usando el Infusion System (Clontech).

Construcciones de Ub aceptora usaron secuencia de Ub de tipo natural como plantilla para PCR con cebadores introduciendo la mutación G76C. Las construcciones previstas como Ub aceptora se clonaron en el vector pOPINE

(Berrow, N. S. *et al. Nucleic Acids Res* **35**, e45, (2007)) que introduce una secuencia KHHHHHH C-terminal (UbCys₇₆Lys₇₇). Los vectores se transformaron en células Mach1 (Invitrogen) según los protocolos del fabricante.

Se realizaron construcciones de diUb lineal que lleva Cys mediante dos operaciones posteriores de mutagénesis sitio-dirigida usando construcción de diUb lineal de tipo natural en el vector pRS (Ye, Y. *et al. EMBO reports* **12**, 350-357, (2011)), para introducir una secuencia de Met-Ala-Cys antes de la Met1 de Ub en el extremo N-terminal, y para introducir la mutación G152C en el extremo C-terminal. La mutagénesis se realizó usando el procedimiento QuikChange (Stratagene) con polimerasa KOD (Merck). El producto de ADN se digirió posteriormente con 1 µl de DpnI durante 1 h a 37°C y se transformó en células Mach1. Todas las construcciones se confirmaron por secuenciación (Cogenics).

Las construcciones de DUB se describieron antes; pOPINS-USP21 (196-565) (Ye, Y. *et al. EMBO reports* **12**, 350-357, (2011)), pOPINK-vOTU (1-169) (Akutsu, M., *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2228-2233, (2011)), pET28-OTUB1(40-271) (Edelmann, M. J. *et al. Biochem J* **418**, 379-390, (2009)) y pGEX6-AMSH (1-424) (McCullough, J., *et al. J Cell Biol* **166**, 487-492, (2004)). Las DUBs se inactivaron mediante mutagénesis sitio-dirigida introduciendo C221A (USP21), C40A (vOTU), C91A (OTUB1) y E280A (AMSH), llevada a cabo como se ha indicado anteriormente.

Expresión de proteínas y purificación

Todas las construcciones se transformaron en células Rosetta2 pLacI (DE3), la expresión proteica se indujo con IPTG 1 mM a una OD₆₀₀ de 1,0, y las células se cultivaron durante 12-16 h a 20°C. Las células se sedimentaron y congelaron súbitamente. Los sedimentos bacterianos que expresan proteínas con etiquetas de His se resuspendieron en tampón A (NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, Tris 50 mM, pH 7,4). vOTU, OTUB1 y AMSH con etiqueta de GST se resuspendieron en tampón de lisis (NaCl 200 mM, DTT 10 mM, Tris 25 mM, pH 8,0). Todas las suspensiones celulares se lisaron mediante sonicación y el lisado celular se depuró a través de centrifugación (30 min, 40000xg, 4°C).

El sobrenadante que contiene proteínas con etiqueta de His se cargó en columna de auto-envasado que contenía 20 ml de resina TALON (Clontech) seguido por elución de una etapa usando tampón B (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 200 mM, pH 7,4). Las proteínas con etiqueta de His-SUMO se escindieron durante una noche con SENP1 recombinante a 4°C. Las etiquetas de His C-terminales se separaron con carboxipeptidasa A (Sigma). Las proteínas con etiqueta GST se incubaron con Glutathión-S-Sefarosa 4B (GE Life Sciences) durante 1 h bajo agitación constante a 4°C. La resina se lavó posteriormente con tampón de alta concentración de sal (Tris 25 mM, NaCl 500 mM, DTT 5 mM, pH 8,5) y tampón de baja concentración de sal (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, DTT 5 mM, pH 8,5). Se usó proteasa C3 PreScission para cortar la etiqueta de GST durante una noche a 4°C.

Las proteínas de Ub se purificaron adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico (MonoQ, GE Healthcare) y las fracciones pico se reunieron y concentraron a concentración >20 mg/ml. Las DUBs se purificaron adicionalmente por cromatografía de intercambio iónico usando ResourceQ o S (GE Healthcare). Las fracciones pico se concentraron a < 5 ml y se purificaron adicionalmente usando filtración en gel (Superdex75, GE Healthcare) en tampón C (disolución salina de tampón fosfato, pH 7,4). La pureza de todas las proteínas, determinada en gel de SDS-PAGE, fue > 95%.

Marcado y purificación de Ubs

Se compraron Alexa488 FluorC5 maleimida y Alexa647 FluorC2 maleimida de Invitrogen, se disolvieron en DMSO (1 mg/300 mL), se congelaron rápidamente en alícuotas de 20 mL y se almacenaron a -80°C. El marcado de mutantes cisteínicos de Ub se obtuvo por reacción de Ub 80 mM en Tris 50 mM, pH 7,2, TCEP 0,5 mM con exceso de 1,2x de fluoróforo disuelto en DMSO. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad durante tres horas. El colorante sin reaccionar se eliminó mediante cromatografía de exclusión por tamaños (columna HiLoad S26/10, GE Healthcare) en tampón de elución (Tris 50 mM, pH 7,4), la proteína sin reaccionar se separó del producto deseado mediante cromatografía de intercambio aniónico (MonoQ 5/50, GE Healthcare) usando tampón de elución y aplicando un gradiente de sal lineal de 0 a 1 M de NaCl. La diUb lineal que comprendía dos residuos de Cys se marcó con una mezcla 1:1 de cada colorante en DMSO siguiendo el mismo procedimiento.

La incorporación de colorantes se confirmó usando espectrometría de masas por electropulverización (ESI-MS).

Ligación de cadenas de Ub y validación

Los mutantes de Ub marcados con fluorescencia se ensamblaron en diUb usando protocolos descritos. Ala₁Cys₀*-UbK11R y UbCys₇₆*Lys₇₇ se ensamblaron en K11NC usando UBE2SΔC (Bremm, A., *et al. Nat Struct Mol Biol* **17**, 939-947, (2010)) en presencia de AMSH. Ala₁Cys₀*-UbK63R y UbCys₇₆*Lys₇₇ se ensamblaron en K63NC usando Ubc13/Uev1a, y Ala₁Cys₀*-UbK48R y UbCys₇₆*Lys₇₇ se ensamblaron en K48NC usando cdc34 (Komander, D. *et al. Mol Cell* **29**, 451-464, (2008)).

Alternativamente, se usó Ala₁Cys₀*-UbLys₇₇ como Ub aceptora para ensamblar variantes de diUb marcada con NN. En principio, se puede introducir Cys para el marcado en cualquier otra posición en la secuencia de Ub.

La diUb doblemente marcada se separó de monoUb y diUb de marcado único mediante cromatografía de intercambio aniónico (MonoQ, GE Healthcare) como se ha descrito anteriormente. En caso de contaminación residual se realizaron operaciones repetidas de MonoQ.

- 5 La diUb doblemente marcada se analizó por MS/MS tras digestión trípica que confirma la especificidad de la reacción de ligación. Las señales de fluorescencia se evaluaron por SDS-PAGE y posterior escaneado de la fluorescencia usando un escáner de fluorescencia Tryphoon a $\lambda = 526$ y 670 nm.

Medidas de anisotropía

- 10 Las medidas de anisotropía de fluorescencia se realizaron usando una cubeta de 1 cm de longitud de paso de luz en un fluorímetro Cary Eclipse (Varian, Palo Alto, CA, USA). Se usó una longitud de onda de excitación de luz linealmente polarizada de 495 y 633 nm para la excitación de fluoróforo dador o aceptor, respectivamente, usando un paso de banda de 5 nm tanto para excitación como emisión. Las emisiones se registraron a 515 y 651 nm. La anisotropía $\langle r \rangle$ se define como

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - G * I_{VH}}{I_{VV} + 2G * I_{VH}} \quad (1)$$

- 15 en donde los subíndices de las intensidades I de luz definen la posición de los polarizadores de excitación (primer subíndice) y de emisión como vertical V u horizontal H . G , el "factor G ", se define como

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2)$$

- 20 Las concentraciones de muestra eran normalmente 3 – 500 nM. La anisotropía es independiente de la concentración.

Medidas conjuntas de FRET

- 25 Las medidas conjuntas de FRET se llevaron a cabo en un fluorímetro Cary Eclipse (Varian, Palo Alto, CA, USA) o un lector de placas Pherastar (BMGlabtech). Se usó una longitud de onda de excitación de 488 nm para excitar el fluoróforo dador, usando un paso de banda de 5 nm tanto para excitación como emisión. Las emisiones se registraron entre 500 y 750 nm. Se determinó el rendimiento de FRET

$$E = \frac{I_D * Q_D}{(I_D * Q_D + I_A * Q_A)} \quad (3)$$

- 30 en donde I_A e I_D son las intensidades de fluorescencia y Q_A y Q_D los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los fluoróforos dador y aceptor, respectivamente. I_A e I_D se determinaron por integración de la señal fluorescente entre 500 y 600 nm para I_A y 620 y 750 nm para I_D , respectivamente. El rendimiento cuántico de Alexa 488, I_D , es 0,92 y 0,33 para Alexa 647, I_A (fuente: Invitrogen).

Ensayos de DUBs por FRET cuantitativa

- 35 Las concentraciones de diUb-FRET se establecieron mediante medidas con equipo Nanodrop usando la señal de fluorescencia a 488 y 633 nm, determinando la cantidad de material marcado, que indicaba que la mayoría de diUb comprendía dos marcadores.

- 40 Los ensayos se realizaron usando lector de placas Pherastar Plus o Pherastar FS en formato de 384 pocillos. Las señales fluorescentes de Alexa 488 y Alexa 647 se monitorizaron usando un módulo óptico de diseño personalizado con longitud de onda de excitación a 485 nm y detección simultánea de emisión a 520 nm y 675 nm. La emisión fluorescente de 10 μ L de diUb-FRET a concentraciones 2x se mide antes de la adición de DUB activa.

- 45 Las enzimas DUBs se diluyeron en serie por 2x las concentraciones dadas y 10 μ l de enzimas se cargaron en cada pocillo con diUb-FRET presente usando una pipeta multicanal o el cargador de muestras automático de Pherastar FS. La pérdida de FRET se monitorizó durante 40 min con tiempo de ciclo de 4 s en emisión de fluorescencia a 675 nm. El intervalo de tiempo entre la carga de la enzima y la primera medida de fluorescencia de cada pocillo es 4 s en el Pherastar FS. El intervalo de tiempo entre la carga de enzima y la medida de fluorescencia usando pipeta

multicanal se estimó en ~ 15 s. 20 μ l de diUb-FRET a la concentración más baja usada en el ensayo sirve como control negativo.

5 Las señales de emisión a 675 nm se usaron para el análisis de datos posterior. La pérdida de emisión fluorescente se representó en Graphpad Prism y se ajustó a decaimientos mono- y bi-exponenciales, a partir de los cuales se calcularon gráficos de residuos. Se usó un ajuste a curva de decaimiento bi-exponencial cuando el valor de la suma absoluta de los cuadrados se redujo en al menos 50% en comparación con un decaimiento mono-exponencial. Cuando se usaron ajustes bi-exponenciales, las curvas de decaimiento individuales de las fases rápidas y lentas se extrajeron usando Graphpad Prism, a partir de la Y_0 calculada, plató y constantes de velocidad (K), usando la ecuación $Y=(Y_0 - \text{plató})\cdot\exp(-K\cdot X) + \text{plató}$. Las velocidades iniciales de la reacción se calcularon mediante diferenciación de las curvas de la fase rápida o la curva de decaimiento mono-exponencial. Se usó el valor en el primer momento para trazar la curva final de Michaelis-Menten.

Medidas de FRET de una sola molécula

15 La instrumentación para detección TCCD y FRET fluorescente de una sola molécula se ha descrito con detalle previamente (Orte, A.; Clarke, R.; Balasubramanian, S.; Klenerman, D. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7707-7715). Para realizar medidas de TCCD ambos láseres se usaron simultáneamente, mientras que para los experimentos de FRET se usó el mismo instrumento, pero sin excitación a 633 nm. Las condiciones de muestra fueron cadena de Ub marcada 25 pM en condiciones nativas (tampón Tris 50 mM a pH 7,4, con Tween20 al 0,01% para evitar la adhesión al vidrio) si no se indica de otro modo.

Análisis de datos de TCCD y FRET fluorescente de una sola molécula

20 Para los experimentos de FRET se analizaron los histogramas de relación de proximidad de todos los intervalos de tiempo con intensidades de aceptor por encima de 7 cuentas ms^{-1} (criterio ACCEPTOR). Este enfoque filtra el pico de cero, sesgando el análisis para solamente eventos FRET significativos. Con el fin de construir los histogramas a partir de experimentos de FRET, la relación de proximidad se define como

$$E = \frac{I_D}{(I_D + I_A \cdot \gamma)} \quad (4)$$

25 en donde I_A e I_D son las intensidades de fluorescencia en los canales aceptor y dador, respectivamente. Estas intensidades se corrigieron por la autofluorescencia de fondo (0,5-1,5 kHz) y la diafonía espectral del canal dador en el canal aceptor (aproximadamente 3%) así como la diferencia en eficacia de detección de los fotomultiplicadores en cada canal cuantificada en la constante del instrumento γ .

30 La constante del instrumento, γ , se encontró que era 0,54 y se determinó comparando el rendimiento de FRET de muestras de ADN con rendimientos de FRET conocidos medidos en la instrumentación de una sola molécula con los rendimientos medidos de un fluorímetro calibrado Cary400.

35 Para experimentos de TCCD, se analizaron solamente los eventos simultáneos significativos, es decir, los eventos simultáneos derivados del azar se restaron de los totales, siguiendo la metodología publicada previamente (Orte, A.; Clarke, R.; Balasubramanian, S.; Klenerman, D. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7707-7715). El parámetro para estudiar los niveles de simultaneidad es el cociente de asociación, definido como

$$Q = \frac{r_S}{r_D + r_A - r_S} = \frac{r_C - r_E}{r_D + r_A - (r_C - r_E)} \quad (5)$$

40 en donde r_S es la velocidad de ráfaga de los eventos simultáneos significativos (los eventos simultáneos fortuitos, r_E , restados de los eventos simultáneos totales, r_C), y r_D y r_A son las velocidades de ráfaga en los canales dador y aceptor, respectivamente. El cociente de asociación es proporcional a la fracción de moléculas doblemente marcadas en disolución.

A diferencia de los histogramas de FRET, en experimentos de TCCD los histogramas se construyen a partir del parámetro Z, dado por (Orte, A.; Clarke, R.; Balasubramanian, S.; Klenerman, D. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7707-7715)

45

$$Z = \ln\left(\frac{I_A}{I_D}\right) \quad (6)$$

en donde I_A e I_D eran como se han definido y corregido anteriormente.

Un procedimiento de ajuste limitado se usó para los histogramas de TCCD. (Ren, X.; Li, H.; Clarke, R. W.; Alves, D. A.; Ying, L.; Klenerman, D.; Balasubramanian, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4992-5000). Las poblaciones que se encuentran en las distribuciones Z se supone que siguen funciones Gaussianas. El centro y las anchuras de las Gaussianas se definen por el brillo medio de los fluoróforos dador y aceptor, $\langle I_D \rangle$ e $\langle I_A \rangle$, respectivamente. Para cada población, el centro de la Gaussiana viene dado por

$$x_c = \ln \left(\frac{\langle I_A \rangle}{\langle I_D \rangle} \right) \quad (7)$$

mientras que la anchura de la función Gaussiana viene dada por k veces la anchura limitada por el disparo:

$$\sigma = K \sqrt{\frac{1}{\langle I_D \rangle} + \frac{1}{\langle I_A \rangle}} \quad (8)$$

Con el fin de limitar el ajuste de los histogramas de TCCD cuando se detectaron poblaciones múltiples, asumimos que el valor del brillo del fluoróforo dador no varía mucho en las dos poblaciones y este valor es igual al brillo medio del fluoróforo durante la medida. Además, se conocen los valores de k , tal como se obtienen a partir de muestras modelo de ADN de doble cadena. Los histogramas de TCCD mostraron anchuras entre 2,2 y 2,5 veces mayores que la anchura limitada por el ruido del disparo. Por tanto, solo tres parámetros de ajuste se usan en este modelo: los valores de brillo del fluoróforo aceptor para las dos poblaciones y la fracción relativa de las especies de FRET baja.

Resultados

Para entender de manera mecánica los principios fundamentales que rigen las interacciones de cadenas de Ub, utilizamos medidas de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Colorantes reactivos de Cys Alexa488 y Alexa647 (Invitrogen) se unieron al extremo C-terminal de una Ub distal, y al extremo N-terminal de una Ub proximal, y se generaron diUb enlazadas a través de Lys63 (K63NC) y Lys48 (K48NC) usando ensamble enzimático específico de enlace. Las propiedades fotofísicas de los colorantes no se vieron afectadas en K48NC, mientras que observamos ligera extinción de Alexa488 en K63NC que se corrigió en medidas posteriores. El rendimiento de FRET es inversamente proporcional a la distancia entre el par de fluoróforos. K48NC y K63NC mostraron fuertes señales de FRET en medidas conjuntas, con rendimientos de FRET de 54% para K48NC y 27% para K63NC que revelan que en el contexto de la diUb los fluoróforos están en distancia de FRET. La incubación de diUb marcada con DUBs activas de la familia de proteasas específicas de ubiquitina (USP) o de tumor ovárico (OTU) (USP21 humana, OTUB1 humana, o el dominio OTU viral de virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo (vOTU)) dio como resultado la desaparición de la señal de FRET, con cinética similar al ensayo basado en diUb previamente establecido. Esto demuestra que los reactivos de FRET monitorizan exitosamente la escisión de diUb, porque la señal de FRET desaparece cuando la molécula de diUb se escinde en monómeros separados.

Para determinar además las distintas conformaciones presentes en K48NC y K63NC, utilizamos técnicas fluorescentes de una sola molécula. Se midieron especies de diUb marcada a concentración picomolar (pM) en condiciones de equilibrio en un equipo de microscopía láser confocal. El número total de moléculas que contienen el par de fluoróforos, independientemente de si está presente una señal de FRET, se evalúa mediante la detección simultánea de dos colores (TCCD), en donde las señales simultáneas se registran con excitación simultánea tanto en la longitud de onda del dador como en la del aceptor (Orte, et al., *Analytical chemistry* **78**, 7707-7715, (2006)). Posteriormente, las poblaciones de diUb que presentan una señal de FRET se registran por excitación a la longitud de onda del dador y posterior detección de señales simultáneas en las longitudes de onda tanto del dador como del aceptor, de la misma muestra en condiciones idénticas como para TCCD. Aunque la comparación de TCCD y FRET revela la proporción de moléculas que comportan FRET, los histogramas de FRET correspondientes a moléculas individuales con rendimientos de FRET similares se pueden ajustar a distribuciones Gaussianas, cada una representando una conformación distinta de diUb.

Para K48NC, todas las moléculas (100% en comparación con TCCD) mostraron una señal de FRET, que además se puede separar en dos poblaciones de FRET distintas. Una especie de FRET alta (rendimiento de FRET $E=0,69$) representa ~85% de todas las moléculas, mientras que el ~15% restante estuvo representado por una especie de FRET baja ($E=0,41$). La distribución de poblaciones de FRET fue coherente con la relación de equilibrio descrita previamente entre estructuras compactas derivadas de medidas de RDC por NMR. Por tanto la especie de FRET alta muy probablemente corresponde a la conformación principal de diUb con zonas hidrofóbicas protegidas, mientras que la especie de FRET baja corresponde probablemente a una conformación con zonas hidrofóbicas parcialmente expuestas.

Para K63NC, la mayoría (63%) de las moléculas doblemente marcadas no mostró una señal de FRET, de acuerdo con una conformación abierta consistente con previos modelos estructurales. Sorprendentemente, una población significativa (37%) de K63NC mostró una señal de FRET alta ($E=0,50$), que indica la presencia de conformaciones de K63NC compactas. Tal(es) conformación(es) compacta(s) explican la fuerte señal de FRET observada en medidas conjuntas, sin embargo no habían sido observadas por NMR (Varadan, *et al. J Biol Chem* **279**, 7055-7063, (2004)).

Las poblaciones de cadenas de Ub observadas en FRET de una sola molécula representan orientaciones de dominios conformacionalmente estables. El tiempo de residencia controlado por difusión de una diUb marcada en el volumen confocal es ~ 1 ms, lo que sugiere que la interconversión entre conformaciones es >1 ms porque de otro modo observaríamos una conformación media.

La comprensión de las conformaciones de las cadenas a nivel de una sola molécula nos permitió investigar si las proteínas que interaccionan con la ubiquitina (UbIPs) tales como las DUBs interaccionan con conformaciones de diUb disponibles ('selección conformacional'), o si remodelan las cadenas tras la unión ('ajuste inducido'). Para ello incubamos K63NC y K48NC a concentraciones μM con UbIPs no marcadas a concentraciones μM que exceden la K_D medida de la interacción.

La estructura cristalina de diUb enlazada a través de Lys63 en el complejo con un anticuerpo específico de enlace (pdb-id 3dvg, Newton, K. *et al. Cell* **134**, 668-678, (2008)) representa la única estructura de una diUb enlazada a través de Lys63 en una conformación compacta. Curiosamente, la incorporación del anticuerpo con K63NC aumenta la FRET alta en relación con la población sin FRET. El rendimiento de FRET equivalente observado en el estado de no unido y unido al anticuerpo ($E=0,5$) sugiere además que el anticuerpo selecciona la conformación de K63NC compacta preexistente, de conformidad con modelos publicados para reconocimiento de anticuerpo/antígeno (James, L. C., *et al., Science* **299**, 1362-1367, (2003)).

Las DUBs acceden al enlace isopeptídico entre restos de Ub para catalizar su hidrólisis. La única estructura compleja DUB-diUb descrita hasta la fecha muestra cómo AMSH-LP, un miembro de la familia de las metaloproteasas JAMM, se une a la conformación abierta de diUb enlazada a través de Lys63 (2zmv, Sato, Y. *et al. Nature* **455**, 358-362, (2008)). En consecuencia, la AMSH inactivada (indicada por el sufijo "i", es decir, AMSHi) agotó la FRET alta y aumentó la población de K63NC sin FRET. Las USPs (la mayor familia de DUBs en seres humanos con >50 miembros) y OTU DUBs (15 miembros en seres humanos) se han descrito hasta ahora solamente en complejo con una monoUb 'distal' enlazada al residuo de Cys del sitio activo (Komander, D., *et al., Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 550-563, (2009)). Estas estructuras revelaron que los cinco residuos C-terminales de la Ub distal se estiran por extensas interacciones, presuntamente separando los restos de Ub para abrir conformaciones. De hecho, la USP21i inactivada (Ye, Y. *et al. EMBO reports* **12**, 350-357, (2011)), o vOTUi (Akutsu, M., *et al., Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2228-2233, (2011)) agotó también la FRET alta y aumentó una población de K36NC sin FRET, similar a AMSHi. Concluimos que mientras que el anticuerpo específico del enlace a través de Lys63 selecciona las conformaciones cerradas de K63NC, las DUBs seleccionan la conformación abierta de K63NC. Por tanto el mecanismo aparente de unión de enlaces a través de Lys63 se puede explicar por selección conformacional.

En contraste con K63NC, las conformaciones abiertas sin FRET no se pudieron observar en K48NC. Sin embargo, tras la incubación de K48NC con USP21i, vOTUi o con la inactivada DUB OTUB1i específica de K48 (Edelmann, M. J. *et al. Biochem J* **418**, 379-390, (2009)), la pérdida de la población de FRET indicó la formación de una nueva conformación de K48NC sin FRET. La conformación sin FRET debe ser un resultado de unión de DUB, porque no se detectó extinción alguna de colorantes en las medidas de tiempos de vida. Por tanto, las DUBs remodelan K48NC en conformaciones abiertas similares a las observaciones realizadas para K63NC, de acuerdo con modelos estructurales. Esto implica que las interacciones de DUBs con cadenas de Lys48 siguen mecanismos de 'ajuste inducido', lo que indica que las DUBs 'abren' cadenas de Ub.

Estos experimentos demuestran además que se pueden usar medidas de FRET para seguir la unión de proteínas que contienen un UBD a poli(ubiquitina), puesto que los UBDs abren la conformación de la ubiquitina tras la unión, produciendo un cambio detectable de la señal fluorescente.

Diversas modificaciones y variaciones de los aspectos descritos y realizaciones de 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 en conexión con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para realizar la invención, que son evidentes para los expertos en la técnica, estén dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sustrato para medir la actividad de una enzima desubiquitinante (DUB), que comprende una molécula de diubiquitina, en donde la ubiquitina C-terminal de la molécula de diubiquitina se marca con un marcador fluorescente, y en donde la Gly76 de dicha diubiquitina C-terminal se sustituye con una secuencia para incorporar el marcador fluorescente.
2. Un sustrato según la reivindicación 1, en donde un residuo de Trp se incorpora con el marcador fluorescente para permitir la cuantificación exacta.
3. Un sustrato según cualquier reivindicación precedente, que comprende tres o más monómeros de ubiquitina.
- 10 4. Un sustrato según cualquier reivindicación precedente, en donde el marcador fluorescente es un reactivo fluorescente biarsenical, preferiblemente en donde el reactivo biarsenical es EDT₂[4',5'-bis(1,3,2-ditioarsolan-2-il) fluorescein-(1,2-etanoditiol)₂].
5. Un sustrato según cualquier reivindicación precedente, en donde al menos dos monómeros de ubiquitina se marcan con diferentes marcadores fluorescentes y en donde los diferentes marcadores fluorescentes constituyen opcionalmente un par para FRET.
- 15 6. Un sustrato según cualquier reivindicación precedente, en donde cada enlace entre los monómeros de ubiquitina comprende un enlace entre un residuo de lisina en la misma posición y el extremo C-terminal de un monómero adyacente.
7. Un sustrato según la reivindicación 6, en donde el residuo de lisina se selecciona del grupo que consiste en K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63, preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en K63, K48 y K11.
- 20 8. Un sustrato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los monómeros de ubiquitina son lineales, enlazados a través de Met 1.
9. Un método para ensayar la actividad de una enzima desubiquitinante (DUB) que comprende exponer un sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, a una DUB y monitorizar la escisión del sustrato mediante anisotropía de fluorescencia o FRET.
- 25 10. Un método según la reivindicación 9, en donde se ensaya la cinética enzimática de la DUB.
11. Un método para ensayar la actividad de unión de un UBD, que comprende exponer un sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, a un UBD que es una DUB inactiva o un UBD que no escinde un sustrato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y monitorizar la unión del sustrato al UBD mediante anisotropía de fluorescencia o FRET.
- 30 12. Un método para ensayar uno o más candidatos inhibidores de la actividad DUB, que comprende las etapas de:
- (a) ensayar una DUB según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para establecer una actividad de referencia para la DUB;
- (b) ensayar una DUB según la etapa (a) en presencia de uno o más candidatos inhibidores de la DUB, y monitorizar los cambios en la actividad.
- 35 13. Un método según la reivindicación 12, en donde la actividad se selecciona de una actividad de unión y una actividad de escisión.
14. Un método según la reivindicación 12, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en un formato de ensayo múltiple.

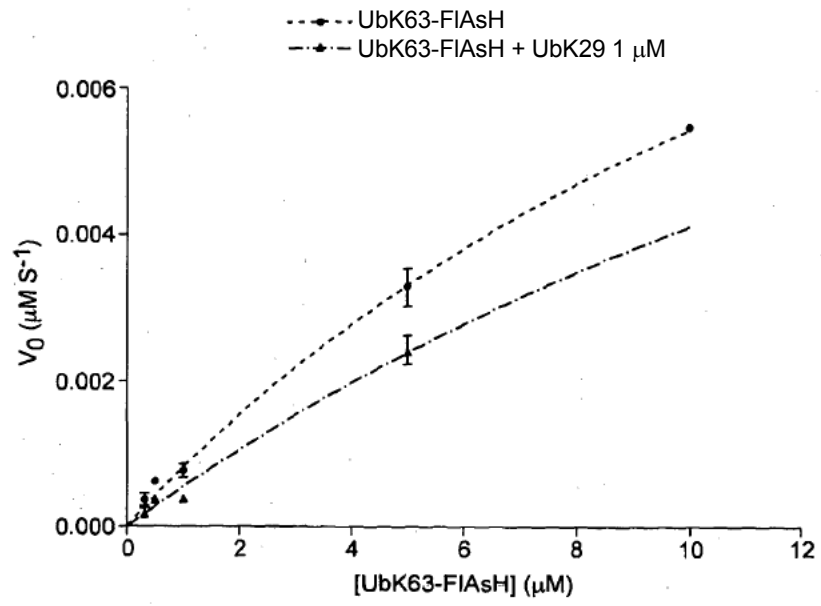


FIG. 1

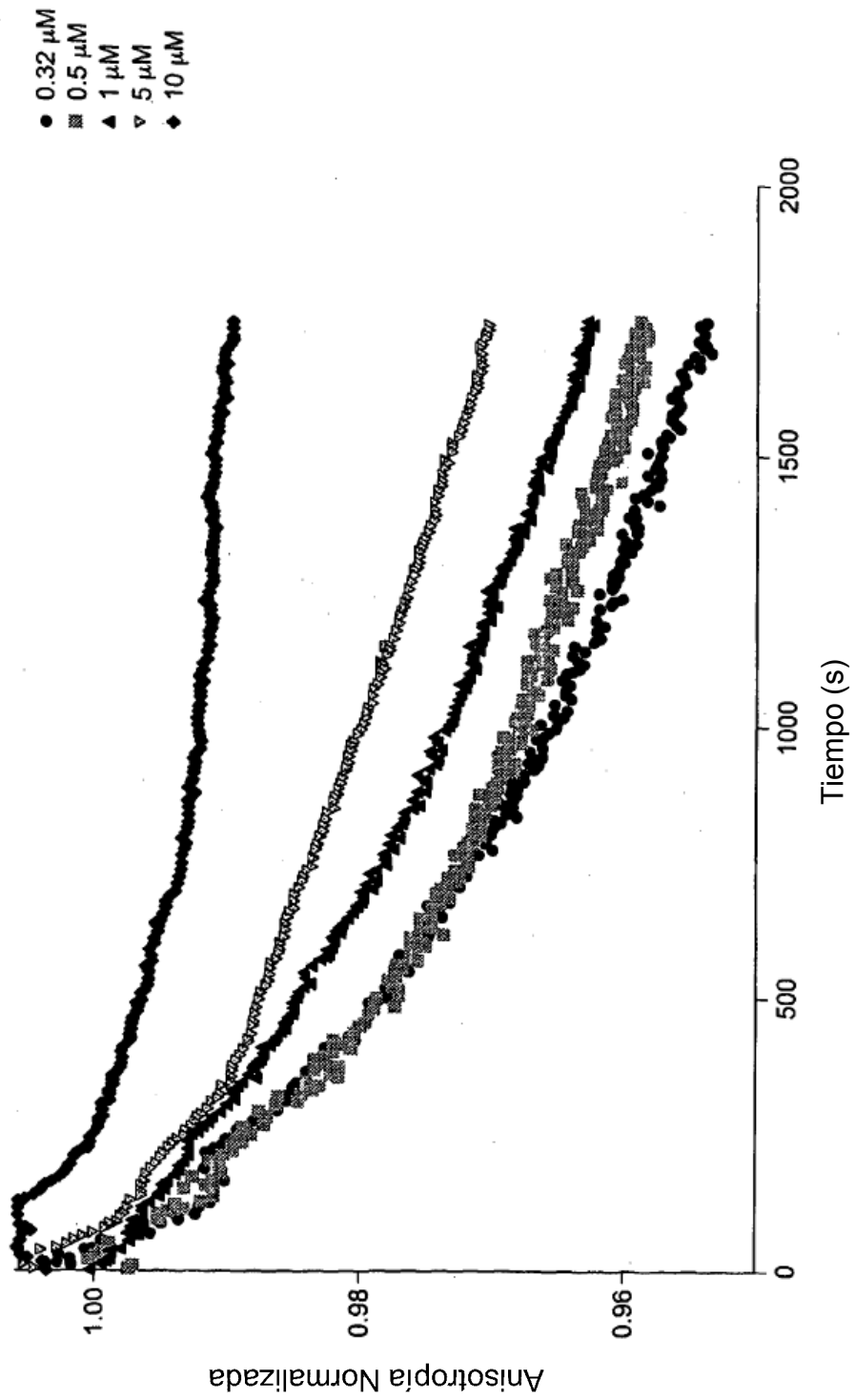


FIG. 2

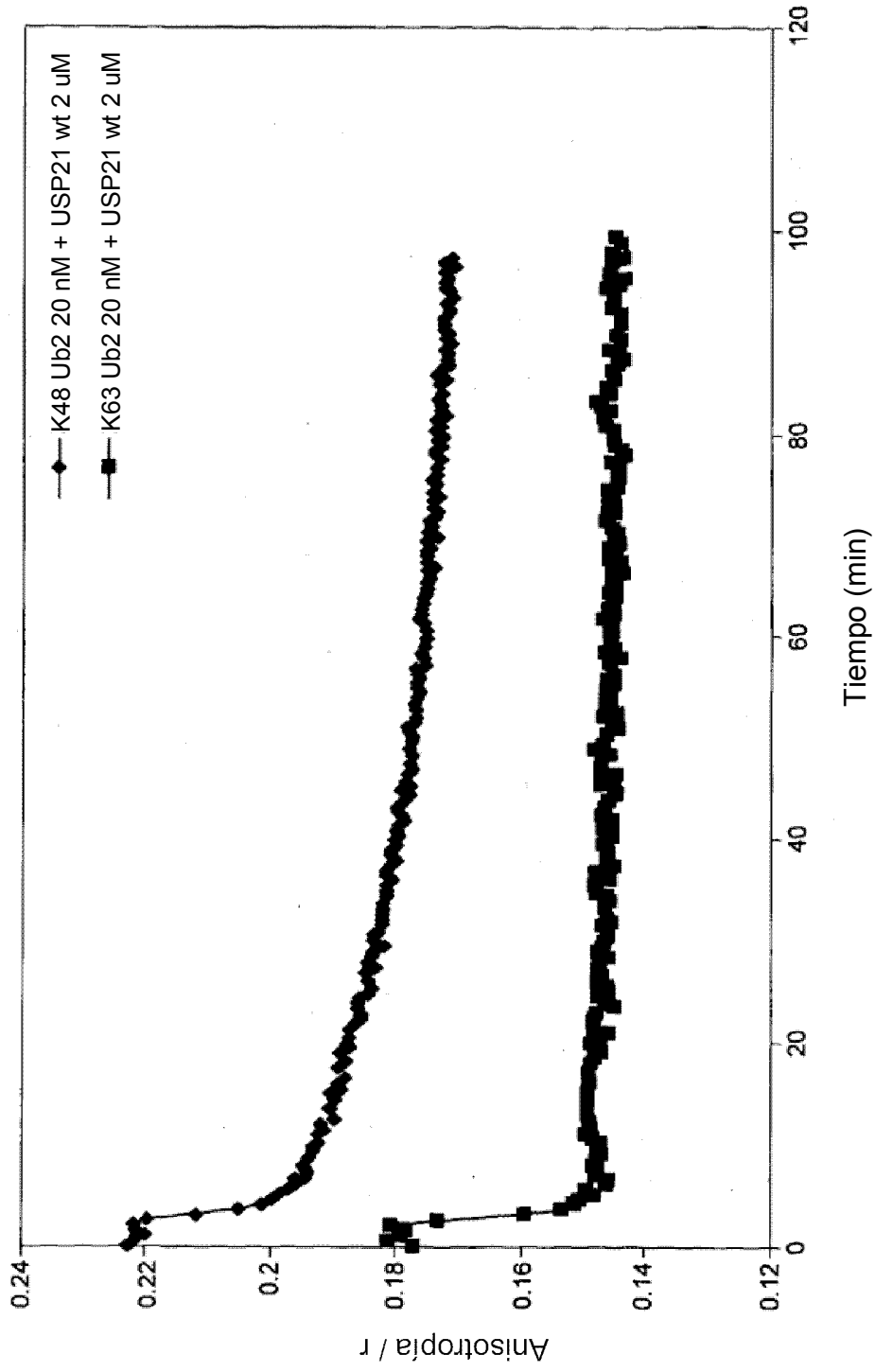
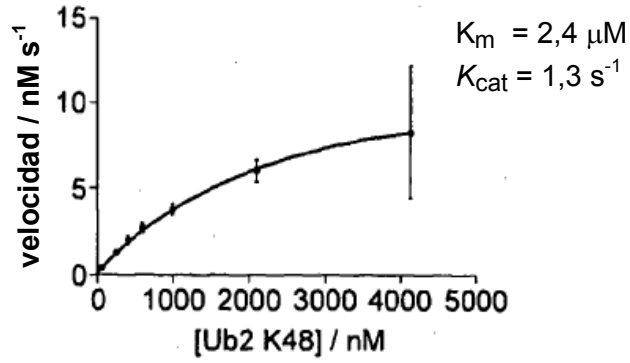


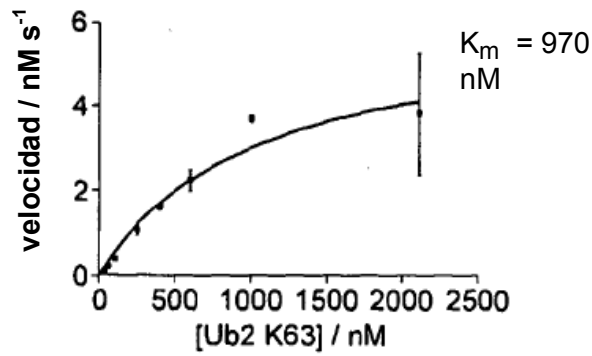
FIG. 3

Cinética de Michaelis Menten derivada de DUB de la familia USP para diferentes tipos de cadena

Cinética de USP21 DUB



Cinética de USP21 DUB



Cinética de USP21 DUB

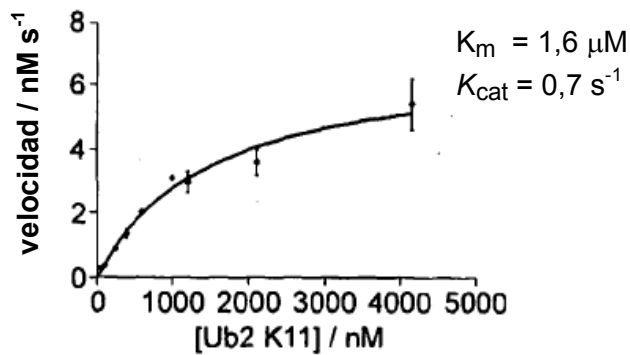
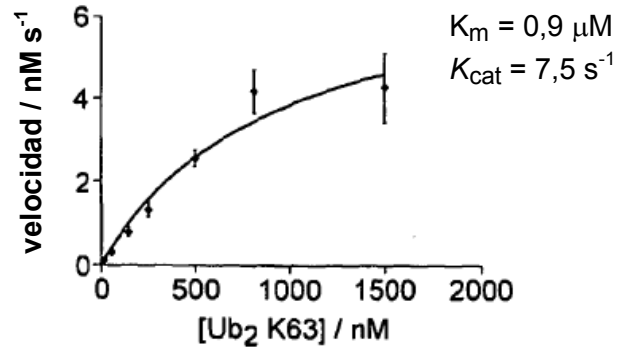
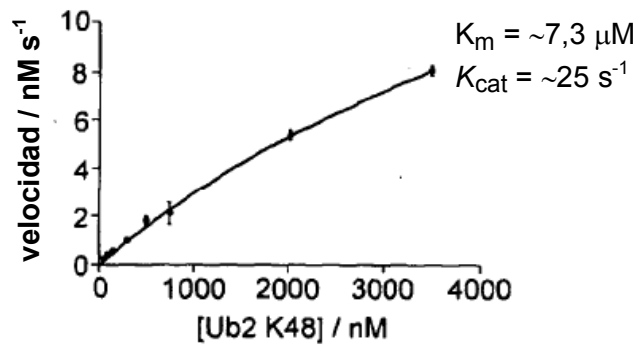


FIG. 4

DUB de la familia OTU
Cinética de vOTU DUB



DUB de la familia OTU
Cinética de vOTU DUB



DUB de la familia JAMM/MPN+
Cinética de AM SH DUB

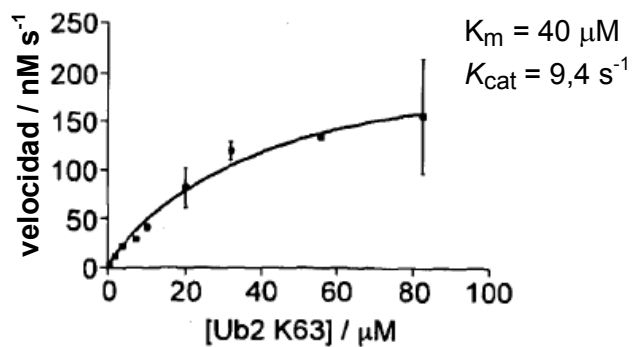


FIG. 5

DUB de la familia OTU
Cinética de OTUB1 DUB

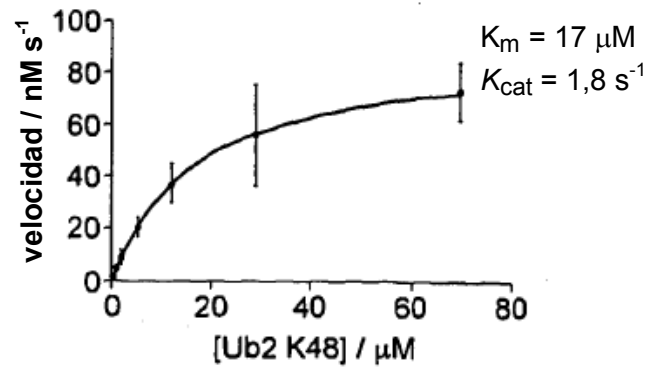
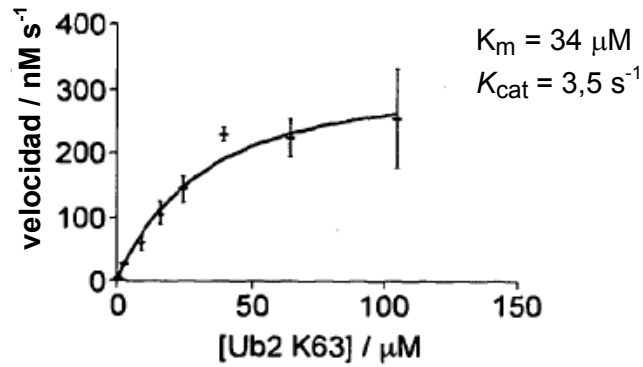


FIG. 5 Continuación

DUB de la familia Josephin
Cinética de Ataxin-3 DUB



DUB de la familia Josephin
Cinética de Ataxin-3 DUB

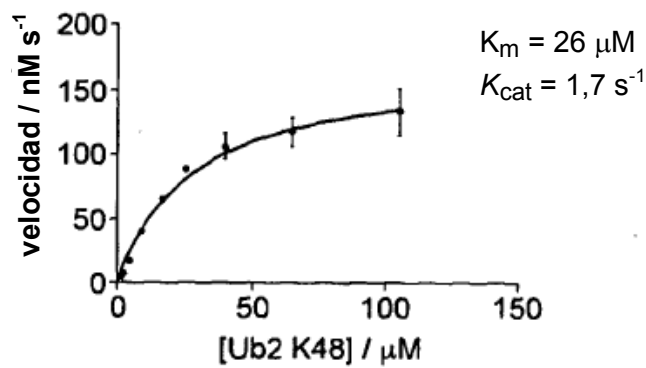


FIG. 6

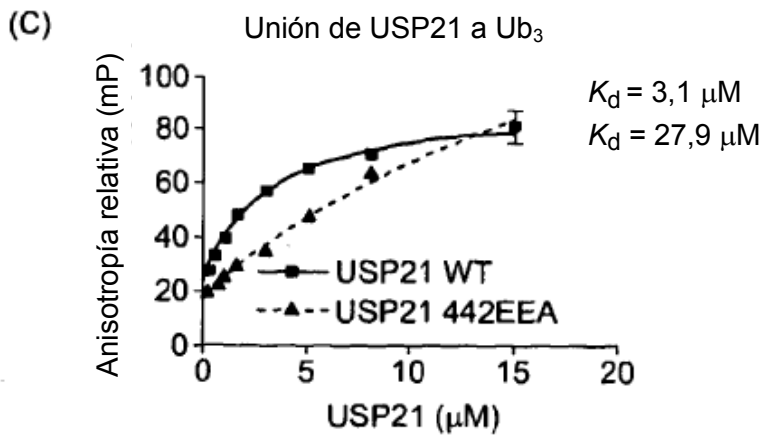
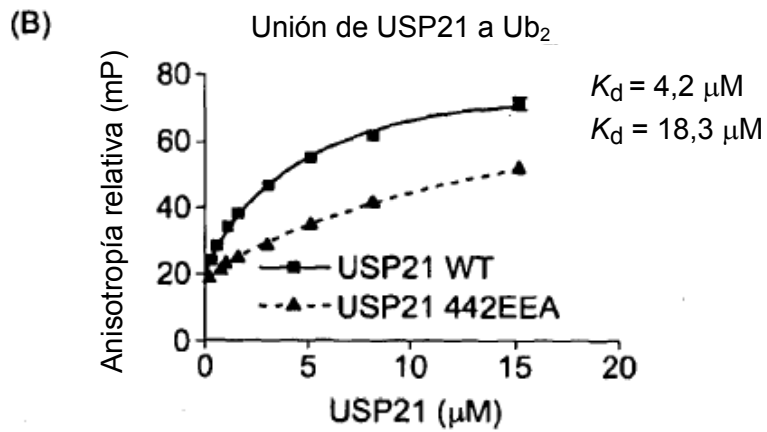
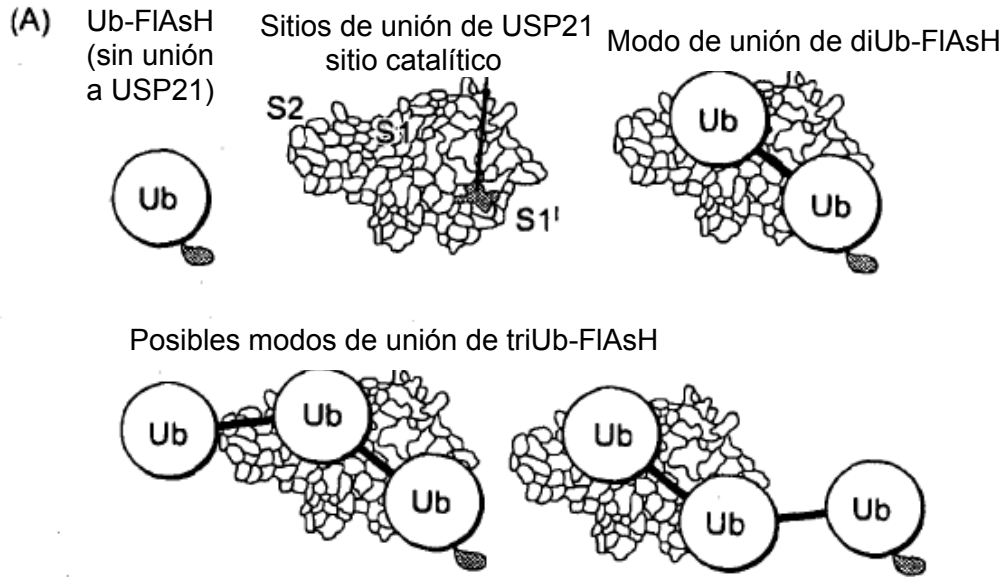


FIG. 7