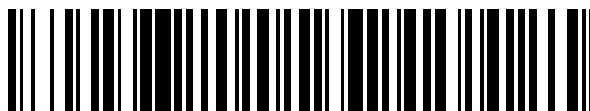


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 573**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/00** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2012 E 12711589 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2714727**

54 Título: **Trampas de SUMO de alta afinidad**

30 Prioridad:

**24.05.2011 US 201161489490 P**

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

**26.12.2014**

73 Titular/es:

**ASOCIACIÓN CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
COOPERATIVA EN BIOCENCIAS-CIC BIOGUNE  
(100.0%)  
Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 801-A  
48160 Derio (Bizkaia), ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ MEDINA, MANUEL SALVADOR**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

**ES 2 525 573 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

Trampas de SUMO de alta afinidad

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la purificación de proteínas diana basándose en su afinidad frente a reactivos de unión específicos. En particular, la invención se refiere a métodos para la purificación por afinidad de unión de SUMO (modificador pequeño de ubiquitina) y proteínas conjugadas con SUMO mediante el uso de proteínas de fusión que comprenden la organización en tándem de motivos de interacción con SUMO.

**Antecedentes de la invención**

Las modificaciones post-traduccionales de proteínas con proteínas de la familia de la ubiquitina son procesos altamente dinámicos que aumentan el potencial de la célula de adaptarse a múltiples situaciones fisiológicas o patológicas (Hayashi *et al.*, 2002; Seufert *et al.*, 1995). La modificación de proteínas por medio del modificador pequeño de ubiquitina (SUMO) da como resultado diversos desenlaces. Las primeras dianas de SUMO identificadas, la proteína oncogénica PML (leucemia promielocítica) y la proteína de transporte nucleocitoplasmático RanGAP1 (activadora de RanGTPasa1), permitieron conectar las funciones de SUMO con la localización nuclear (Matunis *et al.*, 1996; Lapenta *et al.*, 1997; Mahajan *et al.* 1997; Wilkinson y Henley, 2010). La identificación y caracterización de cientos de sustratos de SUMO sugiere el papel de SUMO como regulador de la actividad y estabilidad de las proteínas (Seeler y Dejean, 2003). Las consecuencias corriente abajo están mediadas, al menos en parte, por efectores que contienen motivos de interacción con SUMO o SIM.

Las proteínas SUMO solamente tienen un 20 % de identidad con ubiquitina, sin embargo, tienen una estructura tridimensional similar (Kerscher *et al.*, 2006) (Figura 1). Tres formas de SUMO (SUMO-1, SUMO-2 y SUMO-3) se expresan de forma ubicua y migran con un peso molecular aparente de alrededor de 10 kDa en un gel desnaturalizante de poliacrilamida. SUMO-1 comparte solamente el 50 % de la identidad con SUMO-2 y SUMO-3, pero SUMO-2 y SUMO-3 son idénticas en el 97 %, y forman una subfamilia distinta conocida como SUMO 2/3 (Tatham *et al.*, 2001).

Como ocurre con la ubiquitina, las moléculas de SUMO se generan a través del procesamiento de un precursor de alto peso molecular, cuya escisión expone la firma de doble glicina que está involucrada en su conjugación a sustratos proteicos. Una cascada tiol-éster de 3 reacciones media la conjugación de las moléculas de SUMO (Figura 2). Una única enzima activadora de SUMO (SAE) o E1, activa todas las moléculas de SUMO que se conjugan por E2 Ubc9 (Hay, 2005; Wilkinson y Henley, 2010).

Este proceso está facilitado por una ligasa E3 específica de SUMO. Las ligasas de SUMO E3, tales como los miembros de la familia de PIAS (inhibidor de la proteína de STAT activado) y RanBP3 (proteína de unión a Ran 3), contienen un motivo SP-RING (Nuevo Gen Realmente Interesante) que es esencial para su función (Kahyo *et al.*, 2001 Schmidt y Muller, 2002). Un grupo distinto de ligasas de SUMO está compuesto por la proteína Polycom (Pc2) que está asociada al silenciamiento génico (Kagey *et al.*, 2003). La SUMOilación es una modificación altamente reversible que está mediada por cisteína proteasas específicas de SUMO (SUSP o SEN). En mamíferos se notificaron inicialmente 6 SENP, de las que SENP-1-SENP3 y SENP5-SENP7 son específicas para las proteínas SUMO. La localización de los SENP y la especificidad para las isoformas de SUMO determina su acción (Yeh, 2009). El mapeo inicial de la modificación en los restos de lisina de SUMO permitió la identificación de una secuencia consenso de SUMO compuesto por  $\psi$ KxE, en el que  $\psi$  es un aminoácido hidrófobo grande y x cualquier aminoácido (Rodríguez *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2008). Dicho consenso se descubrió en RanGAP1, PML, p53 y I $\kappa$ B $\alpha$ , entre otras proteínas e interacciona directamente con Ubc9 (Sampson *et al.*, 2001; Wilkinson y Henley, 2010,). La lisina diana entra en el bolsillo catalítico de Ubc9 mientras que los restos hidrófobos y ácidos interaccionan con la superficie de esta E2 (Bernier-Villamor *et al.*, 2002). Sin embargo, no todos los sitios de SUMOilación se ajustan al consenso canónico, la modificación solamente ocurrirá si el consenso presenta una región desestructurada o una superficie de sustrato bien expuesta (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

La estimulación de las proteínas SUMO por sus sustratos podría alcanzarse mediante estrés celular, tales como el choque térmico. Golebiowski y colegas (Golebiowski, 2009) describieron un cambio cuantitativo en los perfiles globales de SUMOilación durante el choque térmico, debido a que los experimentos anteriores demostraron un aumento rápido y reversible de los conjugados de SUMO-2 y SUMO-3 cuando las células se desplazaron de la temperatura normal de crecimiento a 37 °C a la estresante de 43 °C (Saitoh y Hinchev, 2000).

Las consecuencias de la SUMOilación de una nueva diana proteica son difíciles de predecir ya que los cambios de la conformación, creación o de enmascaramiento de las superficies de interacción pueden afectar a la actividad, estabilidad y localización de proteínas modificadas. Las proteínas SUMOiladas se reconocen por los motivos de interacción con SUMO (SIM) presentes en una gran diversidad de proteínas que incluyen la de leucemia promielocítica (PML), proteína asociada al dominio de muerte (Daxx), enzima activadora de modificador similar a ubiquitina 2 (UBA2), inhibidores de las proteínas de STAT activado (PIAS) y las ligasas de la proteína de los dedos

de RING 4 (RNF4) (Geiss Friedlander y Melchior 2007). Los SIM contienen un núcleo hidrófobo flanqueado por restos acídicos (E/D) y uno de serina (Song *et al.*, 2004; Hecker *et al.*, 2006). Los motivos SIM forman una lámina  $\beta$  que se une en orientación paralela o antiparalela entre la hélice  $\alpha$  y una hebra  $\beta$  de SUMO (Figura 3).

5 La afinidad de SIM y SUMO habitualmente es baja, alrededor del intervalo micromolar alto, lo que se debe normalmente a la superficie reducida de interacción. Para aumentar dicha afinidad, proteínas tales como la ligasa dependiente de SUMO RNF4 contiene 4 dominios SIM. Parece que SIM2 y SIM3 juegan un papel más importante en la captura de proteínas SUMOiladas (Tatham *et al.*, 2008). De este modo la PML SUMOilada se dirige a la degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma, proporcionando la primera prueba molecular sobre cómo pueden contribuir las moléculas de SUMO a regular la estabilidad proteica. Se han publicado columnas de afinidad que contienen 4 SIM derivados del fragmento de origen natural 32-133 de RNF4 (Bruderer R *et al.* 2011) y que están comercializadas por BIOMOL (Affinity research).

## 15 Descripción de la invención

### Breve descripción de la invención

Basándose en la observación de que la proteína natural RNF4 (GeneBank ID: 6047) contiene más de un SIM, la presente invención genera proteínas con motivos de afinidad con SUMO adicionales. Estas proteínas manipuladas genéticamente deberían aumentar la afinidad de los SIM individuales para interactuar con dianas de SUMO modificadas, permitiendo el estudio de los mecanismos de post-modificación que conectan las cascadas de señalización con funciones efectoras. De acuerdo con las estructuras moleculares descritas y publicadas para SUMO y los dominios SIM (Figura 3), se esperaba una interacción cooperativa entre las moléculas de SUMO y estas trampas de SUMO diseñadas en la presente invención. Esta invención muestra los polipéptidos que se divulgan en la presente invención, de aquí en adelante citados como motivos de interacción con SUMO en tándem (TSIM) o entidades de unión a SUMO (SUBE) indistintamente, que expresan más de cuatro SIM organizados en tándem, preferentemente, al menos, ocho SIM organizados en tándem. Estos SIM en tándem se pueden usar eficazmente para capturar y analizar proteínas SUMOiladas *in vitro* y/o *ex vivo*. Además, los TSIM de la presente invención muestran una capacidad mayor para purificar proteínas SUMOiladas.

30 De acuerdo con la invención, la expresión "*in vitro*" se refiere a procesos biológicos o reacciones que se realizan usando componentes de un organismo que se han aislado de sus contextos biológicos habituales a fin de permitir un análisis más detallado o más conveniente que los que se pueden realizar con organismos completos, en un ambiente artificial, es decir un laboratorio.

35 De acuerdo con la invención, la expresión "*ex vivo*" se refiere a un proceso que tiene lugar fuera de un organismo. Particularmente, este término se refiere a la experimentación o mediciones hechas en o sobre una muestra o tejido en un ambiente artificial fuera del organismo con la mínima alteración de las condiciones naturales. Las muestras o tejidos se pueden extraer por cualquier método conocido y usarse para el mismo fin en el estado de la técnica.

40 De acuerdo con la invención, el término "tándem" se refiere a la existencia en el mismo ADN o secuencia proteica, de al menos dos o más fragmentos distintos (nucleótidos o aminoácidos), cercanos entre sí pero separados por enlaces o espaciadores, en alternancia. Particularmente, en la presente invención, el término tándem se refiere a más de cuatro repeticiones de SIM, preferentemente al menos, ocho repeticiones de SIM, más preferentemente cuatro repeticiones de SIM2 (SEC ID O: 10) y cuatro repeticiones de SIM3 (SEC ID O: 12), ambas secuencias de la proteína RNF4 (GeneBank ID: 6047), que están organizadas, de modo alternativo en SIM2-enlazador-SIM3-enlazador-SIM2-enlazador-SIM3-enlazador-SIM2-enlazador-SIM3-enlazador-SIM2-enlazador-SIM3, donde los enlazadores son bien enlazadores naturales o artificiales.

50 Para el fin de la presente invención el término "comprende" o "comprender", a lo largo de la presente descripción de patente, incluye, específicamente, el término "consiste" o "consiste en", cuando se refiere, particularmente, a los motivos de interacción con SUMO (SIM) y a las secuencias biológicas. Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende más de cuatro motivos de interacción con SUMO (SIM), donde dichos motivos de interacción con SUMO se unen entre sí por una secuencia enlazadora de aminoácidos artificial (no natural) o por una natural. Preferentemente, los motivos de interacción con SUMO se organizan en tándem y más preferentemente el polipéptido divulgado en la presente invención comprende al menos ocho motivos de interacción con SUMO (SIM) organizados en tándem.

60 Por lo tanto, se ordenaron ocho motivos SIM en tándem obtenidos mediante cuatro repeticiones de la secuencia de SIM2 (SEC ID NO: 10) y la secuencia de SIM3 (SEC ID NO: 12 de RNF4 (GeneBank ID: 6047), espaciados bien por el enlazador natural o un enlazador de poliglicina artificial (Figura 4). Estas construcciones denominadas TSIM1 o SUBE1 (SEC ID NO: 7) y TSIM2 o SUBE 2 (SEC ID NO: 9) respectivamente, se clonaron en un vector de expresión de proteína GST (pGEX6P1 SV5 His6) (SEC ID NO: 5). Esta proteína permite la purificación de los TSIM o SUBE a través de una columna de Glutación-Sepharose (Figura 5). Además de los SIM, este vector permite la expresión de un marcador de His6 N-terminal y epítipo C-terminal reconocidos por anticuerpos específicos (Figura 6). Estos marcadores son útiles para verificar la integridad de las trampas por análisis de transferencia de Western y para

considerar etapas adicionales de purificación por inmunoprecipitación, cuando fuera necesario. Las etiquetas también permiten los procedimientos de inmunodetección (ELISA) y el estudio de la distribución subcelular por inmunofluorescencia indirecta. Otra ventaja de esta construcción es la posibilidad de usar la escisión por proteasas de precisión que eliminan la GST después de la incubación con esta enzima específica. Además, las TSIM1 o SUBE1 (SEC ID NO: 7) contienen un enlazador natural, presente en RNF4, entre las secuencias SIM y TSIM2 o SUBE2 (SEC ID NO: 9) contienen enlazadores de poliglicina sintéticos entre las secuencias SIM. Gracias a los enlazadores sintéticos de poliglicina las TSIM2 o SUBE2 pueden capturar un amplio espectro de proteínas SUMOiladas. Además, en las trampas que combinan TSIM1 (SUBE1) con TSIM2 (SUBE2), el espectro de proteínas SUMOiladas para detectar y/o aislar aumenta con respecto al uso de trampas basadas en TSIM1 (SUBE1) o TSIM2 (SUBE2), de manera independiente.

En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de un polipéptido de acuerdo con la invención para el aislamiento de proteínas SUMOiladas.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción génica de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula que comprende una secuencia de nucleótidos, o una construcción génica, o un vector de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un animal no humano que comprende una secuencia de nucleótidos, o una construcción génica, o un vector, o una célula de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un proceso para obtener un polipéptido de acuerdo con la presente invención, que comprende cultivar una célula de acuerdo con la presente invención en condiciones que permitan producir dicho polipéptido y, si se desea, recuperar dicho polipéptido del medio de cultivo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para el aislamiento de una proteína SUMOilada de una muestra que comprende

- i) incubar un polipéptido divulgado en la presente invención con dicha muestra en condiciones que permitan que dicho polipéptido interactúe con dicha proteína SUMOilada presente en dicha muestra; y
- ii) recuperar dicha proteína SUMOilada que se une a dicho polipéptido.

En un último aspecto, la invención se refiere a un kit que incluye un kit de diagnóstico, que comprende un polipéptido de acuerdo con la presente invención, para la detección/aislamiento de proteínas sumoiladas.

#### Descripción de las figuras

**Figura 1: Comparación de SUMO y ubiquitina.** (a) Alineamiento estructural de los esqueletos de SUMO-1 (gris) y ubiquitina (negro) de la base de datos VAST (NCBI). (b) El alineamiento de secuencias de la ubiquitina (Ub), SUMO-1, SUMO-2 y SUMO-3 de *H. sapiens* y la proteína SUMO de *S. cerevisiae* Smt3 se hizo usando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Las posiciones que son idénticas en todas las secuencias están sombreadas en color oscuro, y las posiciones conservadas se incluyen en recuadros. Las posiciones que son idénticas en al menos tres de las proteínas SUMO, pero no en Ub, están sombreadas en gris (Jonhson, 2004).

**Figura 2: Ciclo de SUMO.** La conjugación de SUMO está mediada por la enzima activadora de SUMO (SAE) o E1 y la enzima conjugadora (E2) Ubc9. Las ligasas E3 de SUMO son distintas y específicas para cada reacción. La maduración y el reciclaje de las moléculas de SUMO están mediados por cisteína proteasas específicas de SUMO (SENP). Los sustratos modificados por SUMO conectan con múltiples funciones.

**Figura 3: Modelo de la estructura de SUMO e interacción con los SIM.** Estructura de lazo del SIM de PIASx unido a la molécula de SUMO1 de acuerdo con la estructura publicada PDB: 2ASQ (Miteva *et al.*, 2010).

**Figura 4: Estructura, secuencias de ADN y aminoácidos de las trampas de SUMO (TSIM).** Los dos tipos de trampas de SUMO contienen los dominios SIM 2 y 3 de la proteína RNF4 (subrayado) y están espaciadas bien por los enlazadores naturales (TSIM1 o SUBE1) o bien por los enlazadores artificiales (TSIM2 o SUBE2).

**Figura 5: Esquema de la estrategia para la preparación, purificación y detección de las trampas de SUMO TSIM.** La parte superior ilustra las etapas de la purificación de TSIM para usar como columnas de afinidad.

**Figura 6: Detección de las trampas de SUMO TSIM.** Detección de proteínas purificadas GST, TSIM1 (SUBE1) y TSIM2 (SUBE2) detectadas por **A)** azul de Coomassie, **B)** por transferencia de Western con anticuerpos anti-GST y **C)** anti- SV5. Los números de la parte izquierda de las fotografías indican el marcador de peso molecular.

**Figura 7: Representación esquemática del ensayo de interacción de proteínas usando TSIM.** Después de la lisis celular, las TSIM son capaces de capturar proteínas SUMOiladas por la afinidad que existe entre los dominios SIM que constituyen las TSIM.

**Figura 8: Captura de PML SUMOilada, y de las cadenas SUMO usando las TSIM.** **(A)** Se puede purificar PML SUMOilada a partir de extractos de células MCF7 antes y después del tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de Adriamicina (ADA), usando TSIM1 (SUBE 1) pero no TSIM 2 (SUBE2). **(B)** La asociación de las TSIM1 (SUBE1) con PML es más fuerte que la que se observa con las TSIM2 (SUBE2) o el control de GST. **(C)** Las cadenas de PoliSUMO se pueden purificar por TSIM1 (SUBE1) a partir de una reacción de SUMOilación *in vitro* usando solamente SUMO1, SUMO2, SUMO3 o una mezcla SUMO2/SUMO3. Se usó GST como control negativo. Los números de la parte izquierda de las fotografías indican el marcador de peso molecular. FT: flujo continuo, fracción sin retener en la columna de purificación (ensayo de interacción).

**Figura 9: Análisis de las cadenas artificiales de SUMO usando TSIM.** **(A)** La capacidad de las TSIM para interaccionar con una fusión SUMO-2 que contiene 4 restos se evaluó mediante un ensayo de interacción con GST. Se usó GST como control negativo. Los números de la parte izquierda de las fotografías indican el marcador de peso molecular. **(B)** La afinidad de ambas TSIM para la fusión de SUMO se estimó por resonancia de plasmón superficial (RPS). Las afinidades estimadas para TSIM1 (SUBE1) y TSIM2 (SUBE2) fue de 42,5  $\mu\text{M}$  y >300  $\mu\text{M}$  respectivamente. EN: entrada; FT: flujo continuo, fracción sin retener en la columna de purificación (ensayo de interacción).

**Figura 10: Acumulación de proteínas SUMOiladas después del choque térmico a 43 °C e inhibición del proteosoma con el tratamiento con MG-132.** Se estresaron las células HeLa a 43 °C **(A, B)** o se trataron con 20  $\mu\text{M}$  del inhibidor del proteosoma MG132 **(C, D)** durante los tiempos indicados. Después de la lisis celular, los extractos celulares totales se analizaron por transferencia de Western con anticuerpos anti SUMO-1 **(A, C)** o anti SUMO-2/3 **(B, D)**. Los números de la parte izquierda de las fotografías indican el marcador de peso molecular. Se usó Anti-GAPDH como control de carga.

**Figura 11: Captura y análisis de proteínas SUMOiladas de extractos celulares.** Las TSIM fueron capaces de efectuar la interacción con las proteínas SUMOiladas de los extractos Hela, después de 30 minutos de tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  de MG-132, seguidos de 60 minutos de choque térmico (43 °C) para aumentar el nivel de conjugados SUMOilados. Se usaron dos condiciones de tampón de extracción/unión. **A)** Tampón que contenía inhibidores de fosfatasa pero no NaCl. **B)** Tampón que contenía NaCl 75 mM. EN-entrada. Fracciones unidas-capturadas. GST como control negativo. Los números de la parte izquierda de las fotografías indican el marcador de peso molecular.

**Figura 12: La inhibición de las hidrolasas de SUMO favorece la captura mediada por TSIM de proteínas SUMOiladas.** Las células HeLa se trataron con 20  $\mu\text{M}$  de MG-132, seguido de 60 minutos de choque térmico (43 °C). Diez minutos antes de la lisis, las células fueron tratadas (+) o no (-) con inhibidor de proteasas PR619 a 100  $\mu\text{M}$ . Las fracciones de TSIM unida se incubaron frente al anticuerpo anti-SUMO 2/3. Los números de la parte izquierda de las fotografías indican el marcador de peso molecular.

## 50 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al papel de la SUMOilación de proteínas en el control de múltiples procesos vitales, particularmente al uso potencial de los SIM para aislar dianas SUMOiladas. La invención ha alcanzado un aumento de la afinidad para proteínas SUMOiladas mediante la organización artificial de los SIM en tándem (TSIM o SUBE). La invención ha usado SIM2 (SEC ID NO: 10) y SIM3 (SEC ID NO: 12) de RNF4 ya que estos muestran una capacidad mayor para interaccionar con proteínas SUMOiladas (Tatham *et al.*, 2008). Usando el tándem natural de SIM2 y SIM3 de la ligasa de ubiquitina dependiente de SUMO RNF4, se ha multiplicado hasta 4 veces esta secuencia para obtener ocho SIM organizados en tándem en cada trampa SUMO. Los ADN que codifican dichos motivos se clonaron uno después del otro con un modo de orientación 5'-3'. Una primera realización se refiere a una versión de TSIM (SUBE) denominada TSIM1 (SUBE1) (SEC ID NO: 6), que mantiene los enlazadores naturales presentes en RNF4 mientras que una segunda realización contiene un enlazador de poliglicina artificial y se denomina TSIM2 (SUBE2) (SEC ID NO: 8) (Figura 4). La flexibilidad de los enlazadores artificiales introducidos en la TSIM2 (SUBE2) aumenta su capacidad de capturar una mayor gama de proteínas SUMOiladas no relacionadas específicamente con RNF4. Además, la invención demuestra que las TSIM (SUBE) se pueden usar para estudiar procesos regulados por SUMO bajo distintas situaciones de estrés celular. Por lo tanto, las TSIM (SUBE) de acuerdo con la presente invención son herramientas moleculares útiles para capturar e identificar proteínas poliSUMOiladas a

partir de los extractos celulares y a partir de ensayos *in vitro*.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende más de cuatro motivos de interacción con SUMO (SIM), en el que dichos motivos de interacción con SUMO se unen entre sí por una secuencia enlazadora de aminoácidos artificial o por una natural. Preferentemente, los motivos de interacción con SUMO (SIM) se organizan en tándem.

En una realización particular de la presente invención, el polipéptido comprende al menos ocho motivos de interacción con SUMO (SIM) organizados en tándem, en el que dichos motivos de interacción con SUMO se unen entre sí por una secuencia enlazadora de aminoácidos artificial o por una natural.

Los motivos de interacción con SUMO se pueden definir como porciones segmentadas de una secuencia polipeptídica que reconoce e interacciona con proteínas SUMOiladas. En una realización particular de la invención, dicho motivo de interacción con SUMO se selecciona del grupo de proteínas que presentan dichos motivos que comprenden, entre otras: PML (Proteína de leucemia promielocítica), Daxx (proteína asociada al dominio de muerte), UBA2 (enzima modificadora similar a ubiquitina 2), PIAS (inhibidor de la proteína de STAT activado), ligasa RNF4 (proteína de los dedos de Zn ring 4) y/o variantes de equivalentes funcionales de las mismas. En una realización preferente de la invención, dicho motivo de interacción con SUMO se selecciona del grupo que comprende un SIM1, SIM2, SIM3, SIM4 y/o combinaciones de los mismos. En una realización más preferente, los motivos de interacción con SUMO son SIM2 (SEC ID NO: 10) y/o SIM3 (SEC ID NO: 12) de la proteína ligasa RNF4 (GeneBank ID: 6047) o variantes funcionalmente equivalentes de la misma.

La expresión "funcionalmente equivalente" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido de acuerdo con la invención que preferentemente conserva al menos una función biológica o actividad de la secuencia de aminoácidos específica de un motivo de interacción con SUMO, preferentemente la capacidad de unirse a SUMO o a una proteína SUMOilada.

En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención comprende cuatro motivos SIM2 y cuatro motivos SIM3 y/o variantes de funcionalmente equivalentes de los mismos. En otra realización preferente de la invención, dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO: 7 y/o SEC ID NO: 9.

Tal como se menciona anteriormente, en una realización particular, el polipéptido de la invención comprende al menos ocho motivos de interacción con SUMO organizados en tándem que se unen entre sí por medio de una secuencia enlazadora de aminoácidos artificial o por una natural.

De acuerdo con la invención, la expresión "enlazador o espaciador" como se usa en el presente documento, se refiere a una región que proporciona espacio entre los motivos de interacción con SUMO. De este modo se asegura que la estructura secundaria de los motivos de interacción con SUMO no esté afectada por la presencia de motivos de interacción con SUMO próximos, de modo que se mantenga la función del motivo de interacción con SUMO. Preferentemente, el enlazador o espaciador es de naturaleza polipeptídica. De este modo la secuencia del ácido nucleico que codifica el enlazador se puede insertar entre las secuencias que codifican el motivo de interacción con SUMO y se puede producir la construcción completa al mismo tiempo. El péptido enlazador preferentemente comprende al menos dos aminoácidos, tal como como al menos tres aminoácidos, por ejemplo al menos cinco aminoácidos, tal como al menos diez aminoácidos, por ejemplo al menos 15 aminoácidos, tal como al menos 20 aminoácidos, por ejemplo al menos 30 aminoácidos, tal como al menos 40 aminoácidos, por ejemplo al menos 50 aminoácidos, tal como al menos 60 aminoácidos, por ejemplo al menos 70 aminoácidos, tal como al menos 80 aminoácidos, tal como al menos 90 aminoácidos tal como aproximadamente 100 aminoácidos. El enlazador o espaciador puede estar ligado al flanco del motivo de interacción con SUMO a través de enlaces covalentes y preferentemente el enlazador o espaciador es esencialmente no inmunogénico, y/o no es propenso a la escisión proteolítica, y/o no comprende ningún resto de cisteína. Los siguientes son ejemplos de secuencias enlazadoras, que se creen especialmente preferentes para la unión con un motivo de interacción con SUMO. Los ejemplos preferentes de péptidos enlazadores o espaciadores incluyen aquellos que se han usado para unir proteínas sin alterar sustancialmente la función de las proteínas unidas o al menos sin alterar sustancialmente la función de una de las proteínas unidas. Más preferentemente los enlazadores o espaciadores se han usado para unir proteínas que comprenden estructuras superenrolladas.

De acuerdo con la invención, la expresión "enlazador o espaciador flexible" como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de región bisagra entre los motivos de interacción con SUMO, que les permite moverse independientemente unos de los otros mientras que se mantiene la forma tridimensional de los dominios individuales. En ese sentido, un enlazador de secuencia flexible de acuerdo con la invención podría ser una región bisagra caracterizada por una laxitud estructural que permite este movimiento.

De acuerdo con la invención, la expresión "enlazador o espaciador artificial (no natural)" como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido enlazador con una longitud de al menos 2 aminoácidos. En una realización más preferente, el péptido enlazador artificial comprende 2 o más aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en glicina, serina, alanina y treonina. En una realización preferente de la invención, dicho enlazador artificial

es un enlazador de poliglicina. En una realización más preferente de la invención, dicho enlazador artificial de poliglicina es un enlazador flexible.

5 De acuerdo con la invención, la expresión "enlazador natural o espaciador" como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia natural presente en proteínas de origen natural que presentan el motivo de interacción con SUMO descrito en la presente invención, incluyendo PML, Daxx, UBA-2, PIAS y RNF4. En una realización preferente de la invención, el enlazador natural es el enlazador presente en la proteína RNF4.

10 En una realización particular de la invención, los polipéptidos de la invención además comprenden la secuencia de aminoácidos de una etiqueta. Dicha etiqueta incluye pero sin limitación: etiquetas de polihistidina (etiquetas-His) (por ejemplo H6 y H10, etc.) u otras etiquetas para el uso en sistemas de cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC), por ejemplo, las columnas de afinidad Ni<sup>2+</sup>, etc., fusiones de Glutación S-Transferasa (GST), fusiones de proteína de unión a maltosa (MBP), etiquetas de estreptavidina, la secuencia diana de biotilización del péptido sustrato de BirA (BSP) de la enzima bacteriana BirA y las etiquetas de epítomos que están dirigidos por anticuerpos (por ejemplo etiquetas c-myc, etiquetas FLAG, entre otras). Dichas etiquetas peptídicas se pueden usar para la purificación, inspección, selección y/o visualización de la proteína de fusión de la invención. En una realización particular de la invención, dicha etiqueta es una etiqueta de detección y/o una etiqueta de purificación. Los inventores han mostrado (ver Ejemplo) que cuando el polipéptido de la invención comprende una etiqueta His<sub>6</sub>x N-terminal y un epítomo c-terminal, estos pueden reconocerse por anticuerpos específicos que permiten la inmunoprecipitación, inmunodetección (ELISA y transferencia de Western) y distribución subcelular por inmunofluorescencia indirecta. Por lo tanto, en una realización preferente de la invención, dicha etiqueta de detección es la etiqueta de epítomo Sv5 y dicha etiqueta de purificación es una etiqueta de polihistidina.

25 La presente invención no solamente se refiere a las secuencias de aminoácidos específicas que se divulgan en el presente documento, sino también a variantes de las mismas, específicamente a variantes funcionalmente equivalentes de las mismas, tales como fragmentos, análogos y/o derivados. Por lo tanto, una variante de una secuencia de aminoácidos específica preferentemente retiene al menos una función biológica o actividad de la secuencia de aminoácidos específica, preferentemente la capacidad de unirse a SUMO o a una proteína SUMOilada.

30 Las variantes de los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden ser (i) una en la que uno o más de los restos de aminoácidos se sustituyen con un resto de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un resto de aminoácido conservado) y dicho resto de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético, (ii) una en la que hay uno o más restos de aminoácidos modificados, por ejemplo, restos que se modifican por la adhesión de grupos sustituyentes, (iii) una en la que el polipéptido es una variante alternativa de corte y empalme del polipéptido de la presente invención, (iv) fragmentos de los polipéptidos y/o (v) una en la que el polipéptido se fusiona con otro polipéptido, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplee para la purificación (por ejemplo, etiqueta His) o para la detección (por ejemplo, etiqueta de epítomo Sv5). Los fragmentos incluyen polipéptidos generados por medio de escisión proteolítica (incluyendo proteólisis multi-sitio) de una secuencia original. Las variantes pueden modificarse post-traduccionalmente, o químicamente. Se considera que dichas variantes están dentro del alcance de los expertos en la materia a partir de la enseñanza del presente documento.

45 Como se conoce en la técnica la "similitud" entre dos polipéptidos se determina mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos y sus aminoácidos conservados sustitutos de un polipéptido respecto a una secuencia de un segundo polipéptido. Las variantes se definen por incluir secuencias polipeptídicas distintas de la secuencia original, preferentemente distintas de la secuencia original en menos del 40 % de los restos por cada segmento de interés, más preferentemente distintas de la secuencia original en menos del 25 % de los restos por cada segmento de interés, más preferentemente distintas de la secuencia original en menos del 10 % de los restos por cada segmento de interés, más preferentemente distintas de la secuencia proteica original en solamente unos pocos restos por cada segmento de interés y al mismo tiempo con suficiente homología con la secuencia original para conservar la funcionalidad de la secuencia original y/o la capacidad para unirse a SUMO o a una proteína SUMOilada. La presente invención incluye secuencias de aminoácidos que son al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 90 % o 95 % similares o idénticas a la secuencia de aminoácidos original. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos computarizados y métodos bastante conocidos por las personas expertas en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP (Manual BLAST, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, 1990).

60 Los polipéptidos de la invención se pueden modificar post-traduccionalmente. Por ejemplo, las modificaciones post-traduccionales que están dentro del alcance de la presente invención incluyen la escisión del péptido señal, glucosilación, acetilación, isoprenilación, miristolación proteolítica, plegamiento proteico y procesamiento proteolítico, etc. Algunas modificaciones o acontecimientos de procesamiento requieren la introducción de maquinaria biológica adicional. Por ejemplo, acontecimientos de procesamiento, tales como la escisión del péptido señal y la glucosilación del núcleo, se examinan añadiendo membranas microsómicas caninas o extractos de huevos de *Xenopus* (Patente de EE.UU. N° 610348) a una reacción de traducción convencional.

Los polipéptidos de la invención pueden incluir aminoácidos artificiales formados por modificación post-traducciona  
o introduciendo aminoácidos artificiales durante la traducción. Está disponible una diversidad de enfoques para  
introducir aminoácidos artificiales durante la traducción proteica. A modo de ejemplo, los ARNt especiales, tales  
como los ARNt que tienen propiedades supresoras, ARNt supresores, se han usado en el proceso de  
5 reemplazamiento de aminoácidos no nativos de sitio dirigido (RAANS). En el RAANS, se requiere un único codón en  
el ARNm y el ARNt supresor, que actúan para dirigir un aminoácido no nativo a un único sitio durante la síntesis  
proteica (WO90/05785). Sin embargo, el ARNt supresor no debe ser reconocible por las aminoacil ARNt sintetasas  
presentes en el sistema de traducción proteica. En ciertos casos, se puede formar un aminoácido no nativo después  
10 de que la molécula de ARNt se aminoacile usando reacciones químicas que modifican específicamente el  
aminoácido nativo y que no alteran significativamente la actividad funcional del ARNt aminoacilado. Estas reacciones  
se citan como modificaciones post-aminoacilación. Por ejemplo, el grupo amino épsilon de la lisina unida a su ARNt  
afín (tARNLYS), se podría modificar con una etiqueta amino específica de fotoafinidad.

Como se explica anteriormente, los polipéptidos de la invención se pueden fusionar con otro polipéptido o etiqueta,  
15 tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación o para la detección. En  
una realización particular, el polipéptido de la invención comprende la etiqueta de proteína glutatión-S-transferasa  
que proporciona la base para la purificación rápida por alta afinidad del polipéptido de la invención. Sin duda, esta  
proteína de fusión GST se puede purificar después a partir de las células por medio de su alta afinidad por el  
glutatión. Las esferas de agarosa se pueden acoplar a glutatión, y dichas esferas de agarosa con glutatión se unen  
20 con proteínas GST. Por lo tanto, en una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se une a  
un soporte sólido. En una realización preferente, si el polipéptido de la invención comprende un resto GST, el  
polipéptido se acopla a un soporte modificado con glutatión. En un caso particular, dicho soporte modificado con  
glutatión es una esfera de agarosa con glutatión. Adicionalmente, se puede incluir una secuencia que codifique un  
sitio de escisión por proteasas entre dicha etiqueta de afinidad y la secuencia polipeptídica, permitiendo de este  
25 modo la eliminación de la etiqueta de unión después de la incubación con esta enzima específica y facilitando por lo  
tanto la purificación de la proteína de interés correspondiente.

En una realización particular, el polipéptido de la invención comprende ocho motivos de interacción con SUMO  
adheridos a través de su N-terminal a un resto de GST y a través de su C-terminal a una etiqueta de detección, en  
30 particular, la etiqueta Sv5 y comprende, adicionalmente, un sitio de escisión por proteasas entre el resto GST y el  
primer dominio SUMOilado y una etiqueta de polihistidina entre el sitio de escisión por proteasas y el primer motivo  
de interacción con SUMO. Se puede ver una representación esquemática de dicha una construcción en la Figura 5.  
En realizaciones preferentes, el polipéptido de fusión comprende cuatro motivos de interacción con SUMO,  
preferentemente motivos SIM2 derivados de RNF4 y cuatro motivos de interacción con SUMO, preferentemente  
35 motivos SIM3 derivados de RNF4 (Figura 5), que están organizados, de modo alternativo SIM2-enlazador-SIM3-  
enlazador-SIM2-enlazador-SIM3-enlazador-SIM2-enlazador-SIM3, en el que los  
enlazadores son bien enlazadores naturales o artificiales.

Como se ha mencionado anteriormente, los inventores han mostrado que los polipéptidos de la invención se pueden  
40 unir a proteínas SUMOiladas. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de los polipéptidos de la  
invención para el aislamiento de proteínas SUMOiladas. En una realización particular, el aislamiento de dichas  
proteínas SUMOiladas se lleva a cabo *in vitro* y/o *ex vivo*, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1 adjunto a  
la presente invención.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención para la identificación de los sustratos de  
45 SUMO. En una realización particular, la identificación de los sustratos de SUMO se selecciona del grupo de  
proteínas que consisten en el supresor tumoral p53 y el inhibidor de NF- $\kappa$ B I $\kappa$ B $\alpha$ .

En otro aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención.  
50 En una realización particular, dicha secuencia se selecciona del grupo que comprende SEC ID NO: 6 y/o SEC ID  
NO: 8.

Las secuencias de nucleótidos de la invención como alternativa pueden tener variaciones de secuencia con respecto  
a las secuencias de nucleótidos originales (SEC ID NO: 6 y SEC ID NO: 8), por ejemplo, sustituciones, inserciones  
55 y/o deleciones de uno o más nucleótidos, con la condición de que el polinucleótido resultante codifique un  
polipéptido de acuerdo con la invención. Por lo tanto, el alcance de la presente invención incluye secuencias de  
nucleótidos que son sustancialmente homólogas a las secuencias de nucleótidos de la invención y codifican un  
polipéptido de la invención.

En el sentido usado en esta descripción, una secuencia de nucleótidos es "sustancialmente homóloga" a cualquiera  
60 de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente cuando su secuencia de nucleótidos tiene un grado de  
identidad con respecto a la secuencia de nucleótidos de la invención de al menos el 60 %, ventajosamente de al  
menos el 70 %, preferentemente de al menos el 85 %, y más preferentemente de al menos el 95 %. Una secuencia  
de nucleótidos que es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos de la invención puede aislarse  
65 típicamente de un organismo productor del polipéptido de la invención basándose en la información contenida en  
dicha secuencia de nucleótidos, o se constituye basándose en la secuencia de ADN que se muestra en SEC ID NO:



6 y SEC ID NO: 8, por medio de la introducción de sustituciones conservativas o no conservativas, por ejemplo. Otros ejemplos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos o dentro de la secuencia. El grado de identidad entre dos polinucleótidos se determina usando algoritmos computarizados y métodos bastante conocidos por las personas expertas en la materia. La identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTN (Manual BLAST, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, 1990).

En otro aspecto, la invención se refiere a una construcción génica, de aquí en adelante construcción génica de la invención, que comprende dichas secuencias de nucleótidos de la invención, En una realización particular, dicha construcción génica se une operativamente a elementos de control de la transcripción, y opcionalmente de la traducción.

La construcción génica de la invención puede incorporar una secuencia reguladora unida operativamente a la secuencia reguladora de la expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención, formando de este modo un casete de expresión. Como se usa en esta descripción, la expresión "unida operativamente" significa que el polipéptido de la invención, codificado por la secuencia de nucleótidos de la invención, se expresa en la fase de lectura correcta bajo el control de secuencias de control de la expresión o reguladoras.

Las secuencias control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y cuando es apropiado, la traducción del polipéptido de la invención, e incluyen secuencias promotoras, secuencias que codifican reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias de terminación de la transcripción. En una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en organismos y células procariotas, por ejemplo, bacterias, etc., mientras que en otra realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en organismos y células eucariotas, por ejemplo, células de insecto, células vegetales, células de mamíferos, etc. Los ejemplos de promotores bien conocidos adecuados para llevar a cabo la invención incluyen promotores constitutivos tales como los que se encuentran en algunos virus eucarióticos (poliomavirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, promotor del gen de la metalotioneína, promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple, regiones LTR retrovirales, promotor de la inmunoglobulina, promotor de la actina, promotor de EF-1 alfa así como también promotores inducibles en los que la expresión del gen corriente abajo requiere de la adición de una sustancia de una señal exógena al cultivo tal como el promotor de tetraciclina, NFKappaB/luz ultravioleta, Cre/lox, promotores de choque térmico, promotores regulables por ARN polimerasa II descritos en el documento WO/2006/135436 así como promotores específicos de tejido, tales como el promotor PSA descrito en el documento WO2006012221. Ventajosamente, la construcción de la invención además comprende un marcador o gen que codifica un motivo o un fenotipo que permite explorar la célula hospedadora transformada con dicha construcción. En una realización particular, la expresión de dicha construcción génica se controla externamente. En una realización más particular, la expresión se controla externamente usando el sistema de doxiciclina Tet-On.

La construcción génica de la invención puede obtenerse por medio del uso de técnicas bastante conocidas en el estado de la técnica (Sambrook *et al.*, 1989).

La construcción génica de la invención se puede insertar en un vector adecuado. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un vector, de aquí en adelante vector de la invención, que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención o construcción génica de la invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se introducirá posteriormente. En una realización particular, el vector de la invención es un vector de expresión. Los vectores adecuados para la inserción de la secuencia de nucleótidos de la invención o la construcción génica de la invención son vectores derivados de vectores procarióticos de expresión tales como pUC18, pUC19, pGEX-6P-1, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, PCR1, RP4, vectores fágicos y "lanzadera" tales como pSA3 y pAT28, vectores plasmídicos de expresión en levaduras tales como el plásmido de 2 micrómetros de levadura, plásmido de integración, vectores plasmídicos episómicos en levaduras (YE<sub>p</sub>), plásmidos similares y centroméricos, vectores de expresión en células de insectos tales como vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de las series pBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas en lugar de basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a adenovirus y retrovirus, y particularmente, lentivirus) y vectores no virales tales como el pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFI/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, PTRACE-HCMV, pUB6N5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCl, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1. A modo ilustrativo, el vector en el que se introduce dicha secuencia de ácido nucleico puede ser un plásmido que esté o no integrado en el genoma de una célula hospedadora cuando se introduce en dicha célula. Los ejemplos ilustrativos no limitantes de vectores en los que se puede insertar la secuencia de nucleótidos de la invención o la construcción génica de la invención incluyen un vector Tet-On inducible para la expresión en células eucariotas.

El vector de la invención se puede obtener por métodos convencionales conocidos por personas expertas en la materia (Sambrook *et al.*, 1989). En una realización particular, dicho vector es un vector útil para transformar células animales.

El vector de la invención se puede usar para transformar, transfectar o infectar células que se pueden transformar, transfectar o infectar con dicho vector. En este sentido, la presente invención también se refiere a una célula que comprende y/o expresa las secuencias de nucleótidos de la invención o una construcción génica de la invención, o un vector de la invención. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. El vector de la invención se puede

5 usar para transformar células eucariotas tales como células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o células de mamíferos, por ejemplo, células epiteliales de riñón 293 o células U2OS, o células HeLa o células procariotas tales como las bacterias *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, por ejemplo.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un animal no humano, de aquí en adelante animal no humano de la invención, que comprende y expresa una secuencia de nucleótidos de la invención, o una construcción génica de la invención, o un vector de la invención, o una célula de la invención. En una realización particular de la invención, el animal no humano de la invención es un mamífero, preferentemente un roedor, más preferentemente un ratón o una rata.

En otro aspecto, la invención se refiere a un proceso para obtener un polipéptido de la presente invención, que comprende cultivar una célula de la invención en condiciones que permitan producir dicho polipéptido y, si se desea, recuperar dicho polipéptido del medio de cultivo. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula dependerán de las células usadas y son bien conocidas por la persona experta en la materia. El proceso para producir el polipéptido de la invención opcionalmente incluye aislar y purificar dicho péptido de la invención. El polipéptido de la invención se puede purificar a partir del medio de cultivo o de extractos celulares (ver Ejemplo 1). El polipéptido de la invención se captura convenientemente usando una matriz de purificación adecuada, concentrándose, una vez eluido, usando un filtro concentrador de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, Amicon o Millipore Pellicon, como se conoce en el estado de la técnica.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el aislamiento de la proteína SUMOilada a partir de una muestra que comprende

- i) incubar un polipéptido de la invención con dicha muestra en condiciones que permitan que dicho polipéptido interactúe con al menos una proteína SUMOilada presente en dicha muestra; y
- ii) recuperar cualquier proteína SUMOilada que se una a dicho polipéptido.

En una realización particular, la etapa de recuperación se lleva a cabo por medio del uso de una columna de afinidad.

En una realización particular, dicha muestra es un extracto celular. Como se describe en el Ejemplo 1 adjunto a la presente invención, a fin de purificar la proteína SUMOilada a partir de extractos celulares, las células se pre-tratan primero con un inhibidor del proteosoma. El motivo para esto es que numerosas proteínas ubiquitinadas y SUMOiladas se recambian rápidamente por los proteosomas, haciendo difícil de detectar este acontecimiento transitorio. Por lo tanto en una realización particular de la invención, cuando dicha muestra es un extracto celular, las células se pre-tratan primero con un inhibidor del proteosoma antes de obtener dicho extracto celular. En un caso particular, dicho inhibidor del proteosoma es MG132 o lactacistina.

Un factor adicional a considerar es la presencia de enzimas desubiquitinadoras y desumoilizadoras (isopeptidasas) en el extracto celular, que pueden eliminar las moléculas de ubiquitina y de SUMO de la proteína de interés, previniendo de este modo la detección de las especies ubiquitinadas y SUMOiladas. Estos problemas se pueden evitar, por ejemplo, preparando el tampón de extracción con compuestos nocivos tales como la yodoacetamina (IAA) o N-etilmaleimida (NEM), que bloquean el resto crítico de cisteína presente en el sitio activo de la mayoría de las enzimas de este tipo. Otro aspecto importante a considerar son las condiciones en las que una proteína se ubiquitina, se SUMOila y se degrada, que son críticas para establecer las condiciones que promueven la degradación del sustrato si se detectan las formas ubiquitinadas y SUMOiladas. Otro factor a considerar es la abundancia de la proteína de interés. En algunos casos, se puede evaluar la modificación por ubiquitina y SUMO de una proteína endógena, mientras que en otros, se requiere la sobreexpresión de la proteína diana. Adicionalmente, es necesario desnaturalizar el extracto antes de la purificación de la proteína diana para demostrar que la proteína de interés está ubiquitinada/SUMOilada en sí misma y no simplemente unida a proteínas co-purificadas adicionales que estén ubiquitinadas/SUMOiladas.

Después de recuperar dicha proteína SUMOilada unida a dicho polipéptido, se puede llevar a cabo la elución de dicha proteína de interés por medio de, por ejemplo, la incubación con una enzima específica, tal como una proteasa, cuando el polipéptido de la invención comprende un sitio diana específico para dichas enzimas, facilitando la purificación de la proteína correspondiente, o desubiquitinando/desumoilando la proteína recuperada usando enzimas de desubiquitinación/desumoilación como se describe, por ejemplo, en el documento WO0406514, o como alternativa, usando condiciones desnaturalizantes o por métodos de centrifugación.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit, de aquí en adelante kit de la invención, que comprende el polipéptido de la invención. En la presente invención, un "kit" se entiende como un producto que contiene distintos reactivos para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la presente invención. Los kits de la invención pueden

comprender un envase que permita mantener los reactivos dentro de determinados límites. Los materiales adecuados para preparar dichos envases incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, bolsitas y similares. El kit de la invención puede contener adicionalmente instrucciones para usar los reactivos en el método de la invención. Dichas instrucciones se pueden encontrar en la forma de material impreso o en la forma de un soporte electrónico que puede almacenar instrucciones de modo que puedan leerse por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden contener adicionalmente o como alternativa sitios web de Internet que proporcionen dichas instrucciones. En una realización particular, dicho kit además comprende un soporte sólido. En una realización más particular, dicho soporte sólido es agarosa. En otra realización particular, el kit de la invención además comprende todos los elementos necesarios para llevar a cabo el método que se divulga en la presente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deberían considerarse en un sentido limitante, sino más bien en un sentido ilustrativo de la invención.

## EJEMPLO 1

### Métodos.

#### Clonaje Molecular de oligonucleótidos sintéticos que codifican SIM2 y SIM3 de RNF4.

Los oligonucleótidos sintéticos que codifican los SIM2 y SIM3 de la proteína RNF4 (GenBank ID: 6047) se clonaron en el vector PGEX-6PI (Amersham) usando cebadores específicos tal como sigue: para TSIM1 (SUBE1) se usaron cebadores con SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2 y para TSIM2 (SUBE2) cebadores con SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4. Este vector se modificó introduciendo un enlazador, en fase, con una etiqueta His6 y un epítipo SV5 cadena arriba y cadena abajo del sitio de clonación múltiple, respectivamente, conduciendo al vector PGEX-6P1 modificado (SEC ID NO: 5). Dichas modificaciones permiten el reconocimiento de la proteína por anticuerpos específicos. Los fragmentos que codifican los SIM2 (SEC ID NO: 10) y SIM3 (SEC ID NO: 12) de la proteína RNF4 se introdujeron en estas construcciones, separados bien por las secuencias naturales de RNF 4 (TSIM1 o TUBE1) o por un enlazador de poliglicina (TSIM2 o SUBE2) (Figura 4).

#### Ensayo de interacción de proteínas.

A fin de usar las TSIM como columnas de afinidad para realizar el ensayo de interacción de las proteínas SUMOiladas, se cultivaron las células HeLa en medio DMEM (Gibco) complementado con FBS 10 % y el 1 % de antibióticos a 37 °C. Treinta minutos antes de recogerlas, se trató a las células con 20 µM de MG-132 a 37°C y se las estresó durante 60 minutos por choque térmico a 43 °C para inducir los conjugados SUMOilados. Después se realizó la lisis celular bien en fluoruro de sodio 50 µM, pirofosfato de tetrasodio 5 mM, beta-gliceropirofosfato 10 mM, Igepal CA-630 1 %, EDTA 2 mM, Na2HPO4 20 mM/NaH2PO4 20mM pH 7,5, o fluoruro de sodio 25 mM, pirofosfato de tetrasodio 2,5 mM, beta-gliceropirofosfato 5 mM, Igepal CA-630 1 %, EDTA 1mM, Na2HPO4 10mM/NaH2PO4 10mM pH 7,5, Tris 25 mM pH 8,5, NaCl 75 mM, EDTA 2,5 mM, complementado con PMSF 1 mM y cóctel de inhibidor de proteasas completo 1,2 mg/ml (Roche).

Se incluyeron o no doscientos microgramos de TSIM1 (SUBE1), TSIM2 (SUBE2) o GST (como control) en el tampón de lisis antes de la sonicación, como se indica en las leyendas de las figuras. La etapa de unión se realizó usando esferas con GST (Biontex) con lavados posteriores con Tris 50 mM pH 8,5; NaCl 50 mM, EDTA 5 mM e Igepal 1 % y se realizó la elución con tampón de Laemmli (Figura 7).

Para la captura de la PML SUMOilada, se estimularon 3 millones de células de cáncer de mama de la línea MCF-7 con UV (25 J/m2) y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis que contenía 50 µM de PR619 (inhibidor de proteasas) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). Después se sonicaron las células dos veces durante 15 segundos. Las células lisadas se centrifugaron después durante 10 min a 13000 rpm, 4 °C. Se guardó una alícuota de sobrenadante (Entrada) y el resto se mezcló con 200 µg de control GST (GST), TSIM1 (SUBE1), TSIM2 (SUBE2) o no TSIM (SUBE) y no estimulación (NE), junto con las esferas con GST rotando 4 h a 4 °C. Las esferas de GST se lavaron después 3 veces con 1 ml de tampón de lavado (tampón de lisis que contenía solamente NaCl 50 mM) y las esferas con GST se resuspendieron en tampón de Laemmli. Para el análisis de transferencia de western, las muestras de entrada y de esferas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10 % y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF a 400 mA durante 2 horas. Se incubó la membrana con anticuerpo anti-PML (Bethyl Laboratories Inc, Tejas, EE.UU.).

#### Ensayo *in vitro* de cadenas de SUMO

Para este ensayo, se usó un tampón que contenía un sistema de regeneración de ATP, Tris 50 mM pH 7,5, MgCl2 10 mM, ATP 2 mM, fosfato de creatina 10 mM (Sigma), 3,5 U/ml de cretina quinasa (Sigma), y 0,6 U/ml de pirofosfatasa inorgánica (Sigma). Las reacciones de realizaron como se cita: 10 µg de SUMO-1, 2 o 3 o 5 µg (si se

usan en combinación con SUMO-2 y SUMO-3), 0,325 µg de Ubc9 (ligasa de SUMO E2) y 0,08 µg de SAE1/2 purificada (ligasa de Sumo E1) (Biomol). Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 2 horas y se pararon mediante la adición de tampón de carga de la muestra con SDS. Los ensayos de interacción se llevaron a cabo guardando 1/10 de la entrada y uniendo el resto de la reacción con 100 µl de esferas de agarosa con GST y 50 µg de TSIM1 (SUBE1) durante 4 h y/o durante toda la noche a 4 °C en rotación, con 1 mM de DTT (Ditiotreitol). Después de la unión, se centrifugaron las muestras a 1200 rpm, 5 min a 4 °C. Una pequeña fracción se unió para analizar la fracción no unida, y después las esferas se lavaron 5 veces con 2 ml de PBS 1X con el 0,05 % de Tween 20. Después se eluyeron las muestras en 100 µl (50 µl de BBX3+ 50 µl de PBS/0,05 % de Tween20). Los productos de reacción se resolvieron por SDS-PAGE (10 %).

## RESULTADOS

### Expresión y purificación de las TSIM.

Las proteínas TSIM se expresaron en la cepa BL-21 de *Escherichia coli*, de acuerdo con procedimientos convencionales. Después de eso, se cosechó el sedimento bacteriano por centrifugación y se realizó la lisis celular en PBS/NaCl 0,5 M por sonicación. Se mantuvo la misma concentración de sal a lo largo del procedimiento incluyendo las condiciones de almacenamiento. Los residuos resultantes se separaron también por centrifugación y el sobrenadante resultante se incubó con esferas de agarosa con GST (Glutathión-S-transferasa). Las TSIM se obtuvieron después por elución usando glutathión reducido. Las proteínas recombinantes se mantuvieron en PBS/NaCl 0,5 M y el 10 % de glicerol, a -80 °C hasta su uso.

### TSIM1 (SUBE1) interacciona con cadenas de poliSUMO.

Para verificar la funcionalidad de estas construcciones recombinantes de interacción TSIM, se analizó su capacidad para interactuar con el sustrato natural de RNF4, PML SUMOilada. Se descubrió que la TSIM1 (SUBE1) modificada genéticamente pero no la TSIM2 (SUBE2) interacciona con la PML SUMOilada purificada a partir de células MCF7 (línea celular de cáncer de mama) estimuladas o no con un estímulo nocivo genotóxico con 1 µM de Adriamicina (ADA) (Figura 8A). En las condiciones que se usan la PML SUMOilada muestra poca o ninguna interacción con TSIM2 (SUBE2) o control GST (Figura 8B). Sin embargo la forma no modificada de PML interacciona con estas proteínas y con el control no específico (NE) hecho solamente con esferas de agarosa (Figuras 8B). Así como los SIM de RNF4 interactúan con PML solamente cuando está SUMOilada, la capacidad de TSIM1 (SUBE1) para interactuar con cadenas de poliSUMO se ensayó usando un ensayo de SUMOilación *in vitro*. En este sistema no se añadió ni sustrato ni la enzima de SUMO E3, dando como resultado la producción modesta de cadenas de poliSUMO. Las cadenas que contenían hasta 2 moléculas de SUMO-1 o 3 moléculas de SUMO-2 o SUMO-3 solo pudieron verse en la entrada (Figura 8C alta exposición). Sin embargo, las cadenas que contenían más de 4 cadenas de SUMO se pudieron recuperar en la fracción unida a TSIM1, siendo el más eficaz, el ensayo de interacción realizado con una mezcla de SUMO-2 y SUMO-3 (Figura 8C alta exposición). En estas condiciones TSIM1 (SUBE1) no se une al SUMO-1 libre pero muestra una unión modesta al SUMO-3 libre y, más importante, a SUMO-2 y SUMO-3 libre, lo que sugiere las preferencias naturales de los SIM2 y SIM3 de RNF4 (Figura 8C baja exposición). Además, no se observaron uniones a GST de las cadenas de poliSUMO libres. El conjunto de todos estos resultados indica que las TSIM1 (SUBE1) se unen a proteínas poliSUMOiladas tales como PML o a cadenas de SUMO que contienen más de cuatro restos de SUMO.

### Las TSIM muestran mayor afinidad por cadenas de poliSUMO.

Para investigar la afinidad que tienen los TSIM frente a las cadenas poliSUMOiladas, los inventores usaron una fusión de SUMO que contenía 4 moléculas (Taham MH *et al*, 2008). Dos enfoques distintos, el ensayo de interacción con GST y la resonancia de plasmón superficial (RPS), muestran que TSIM1 (SUBE1) tiene mayor afinidad por esta fusión de SUMO recombinante tetramérica. Un ensayo de interacción con GST muestra diferencias significativas en la afinidad entre TSIM1 (SUBE1) o TSIM2 (SUBE2) y la fusión de SUMO (Figura 9A). Usando RPS, se estimaron esas afinidades para 43,6 µM y > 400 µM para TSIM1 (SUBE1) y TSIM2 (SUBE2) respectivamente (Figura 9B). Los experimentos de RPS se realizaron en un sistema Biacore 3000, equilibrado a 25 °C en tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 0,005 %) (Biacore), usando un chip sensor CM5 con un anticuerpo anti-GST (Biacore) inmovilizado covalentemente con una densidad de aproximadamente 9000 unidades de resonancia (UR ≈ µg/mm<sup>2</sup>). Se capturaron dominios SIM fusionados con GST en tándem en el chip sensor con unas densidades medias (200-250 UR). Las moléculas de monoubiquitina (Sigma Aldrich) y similares a ubiquitina SUMO-1, -2, y SUMO-3 (producidas como se ha descrito anteriormente (Rodríguez *et al*, 1999)) se inyectaron después durante 30 s a un caudal de 30 µl/min, y tetra-SUMO2 (Bruderer *et al.*, 2011) durante 50 s a 30 µl/min. Todas las inyecciones se hicieron aleatoriamente.

Los datos obtenidos por RPS confirmaron que TSIM1 (SUBE1) reconoce cadenas de poliSUMO mientras que TSIM2 (SUBE2) no lo hace. Además los resultados mostrados en la presente invención subrayan la importancia de los aminoácidos acídicos de los SIM y la región enlazadora entre los SIM en el proceso de reconocimiento.

### **Purificación de las proteínas poliSUMOiladas totales inducidas después del estrés celular.**

Para investigar si las TSIM pueden interaccionar con las proteínas SUMOiladas totales se usaron extractos celulares purificados para ajustar las condiciones de acumulación de proteínas SUMOiladas usando tratamiento de estrés por choque térmico (43 °C) en células HeLa (Figura 10A y B). Los análisis por transferencia de Western llevados a cabo en estas células HeLa mostraron que las proteínas SUMOiladas aumentaban después de 15 a 30 minutos de choque térmico con una acumulación prominente después de 60 minutos (Figura 10A y B). También se observó que mientras que SUMO-2/SUMO-3 se acumulaba 15 minutos después de estos tratamientos, la acumulación de SUMO-1 fue más obvia después de 60 minutos de tratamiento. Resulta interesante que tanto SUMO-1 como SUMO-2/SUMO-3 se acumulaban en tiempos similares lo que sugiere una activación simultánea de la conjugación de ambos tipos de modificadores (Figura 10A y B).

Recientemente, se ha asociado la SUMOilación con la ubiquitinación y se sabe que la inhibición de la actividad del proteosoma acumula proteínas SUMOiladas. Para evaluar el papel del proteosoma en el metabolismo de proteínas conjugadas con SUMO y explorar adicionalmente las condiciones de acumulación de proteínas SUMOiladas, se realizó la cinética de los inhibidores del proteosoma en células HeLa (Figura 10C y D). Las células se trataron con 20 µM del inhibidor del proteosoma MG132 durante los tiempos indicados. Se pudo observar fácilmente que las proteínas SUMOiladas aumentaban después de 30 minutos de tratamiento con MG132. Por este motivo, se seleccionaron las condiciones anteriormente mencionadas, 30 minutos de tratamiento con MG132 y 60 minutos de choque térmico, para acumular/preservar las proteínas SUMOiladas.

### **Las TSIM como columnas de afinidad**

A fin de verificar el uso de las TSIM como columnas de afinidad para realizar la captura de las proteínas SUMOiladas, la invención usó los ensayos de interacción con GST para capturar las proteínas SUMOiladas de los extractos de las células HeLa. Para enriquecer las proteínas SUMOiladas en las células, se han notificado diversos estímulos. Aquí, en la presente invención, se usó un pre-tratamiento durante 30 minutos con inhibidores del proteosoma seguido de estimulación por choque térmico a 43 °C durante 60 minutos. Se ensayaron varias condiciones de extracción para aumentar una extracción eficaz y captura óptima de las proteínas SUMOiladas. Debido a la arquitectura y a las propiedades de cada una de las TSIM, ambas trampas de SUMO mostraron condiciones óptimas de captura en distintos tampones. La ausencia de NaCl en el tampón favorecía la captura de proteínas SUMOiladas por TSIM1 (SUBE1) (Figura 11A). Por el contrario la eficiencia de captura de TSIM2 (SUBE2) mejoró en la presencia de NaCl 75 mM (Figura 11B), en condiciones en las que la entrada fue comparable tanto para las condiciones de extracción como para las de unión.

Resulta interesante que la capacidad de TSIM1 (SUBE1) para capturar dianas SUMOiladas puede aumentar añadiendo PR619 (Life-Sensors), el primer inhibidor de las enzimas desubiquitinadoras/desumoiladoras permeable a las células (Figura 12).

40

**Bibliografía**

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-10.
- 5 • Bernier-Villamor V., Sampson D. A., Matunis M. J. y Lima C. D. 2002. Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108, 345-356.
- Bruderer R, Tatham MH, Plechanovova A, Matic I, Garg AK, Hay RT. 2011. Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates. *EMBO Rep.* Febrero; 12(2):142-8.
- 10 • Geiss-Friedlander R. y Melchior F. 2007. Concepts in SUMOylation: a decade on *Nature reviews molecular cell biology* 8; 947-956.
- Golebiowski F., Matic I., Tatham M., H., Cole V., Yin Y., Nakamura A., Cox J., Barton G., J., Mann M., y Hay R.T. 2009. System-Wide Changes to SUMO Modifications in Response to Heat Shock. *Sci. Signal.*, 2 (72) 24.
- Hecker C. M., Rabiller M., Haglund K., Bayer P. y Dikic I. 2006. Specification of SUMO1- and SUMO2- interacting motifs. *J. Biol. Chem.* 281, 16117-16127.
- 15 • Hay R. 2005. SUMO: A History of Modification. *Molecular Cell*, 18 1-12.
- Hayashi T., Seki M., Maeda D., Wang W., Kawabe Y., Seki T. J. 2002. Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp. Cell Res.* 280, 212-221.
- Johnson E. S. 2004. Protein modification by SUMO. *Annu. Rev. Biochem* 73:355-382.
- 20 • Kagey M.H., Melhuish T.A., y Wotton D. 2003. The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, 127-137.
- Kahyo T., Nishida T., Yasuda H. 2001. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol. Cell.* 8 (3): 713-8.
- Kerscher O., Felberbaum R., Hochstrasser M. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 159-180.
- 25 • Lapenta, V., Chiurazzi, P., van der Spek, P., Pizzuti, A., Hanaoka, F. y Brahe, C. 1997. SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics* 40, 362-366.
- Matunis, M. J., Coutavas, E. y Blobel, G. 1996. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 135, 1457-1470.
- 30 • Mahajan, R., Delphin, C, Guan, T., Gerace, L. y Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.
- Miteva M., Keusekotten K., Hofmann K., Praefcke G., y Jürgen Dohmen R. Sumoylation as a Signal for Polyubiquitylation and Proteasomal Degradation. 2010. Capítulo 16. Páginas 195-214. Bookshelf ID: NBK25447
- 35 • Conjugation and Deconjugation of Ubiquitin Family Modifiers editado por Marcus Groettrup.
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. 1999. *EMBO J.* 15 de noviembre; 18(22):6455-61.
- Rodriguez M. S., Dargemont C. y Hay R. T. 2001. SUMO-1 conjugation *ex vivo* requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J. Biol. Chem.* 276, 12654-12659.
- 40 • Sambrook J., MacCallum P. *Molecular cloning, a Laboratory Manual.* 1989. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol 1-3.
- Saitoh H, Hinchey J. 2000. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*; 275:6252-6258.
- Sampson DA, Wang M, Matunis MJ. 2001. The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem.* 276(24):21664-9.
- 45 • Seufert, W., Futcher, B., y Jentsch, S. 1995. Role of ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373, 78-81.
- Seeler, J., S. y Dejean, A. 2003. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:690-9.
- 50 • Schmidt, D. y Muller, S. 2002. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2872-2877.
- Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G. y Chen, Y. 2004. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14373-14378.
- Tatham M.H., Jaffray E., Vaughan O.A., Desterro J.M., Botting C.H, Naismith J.H., Hay R.T. 2001. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.* 276, 35368-35374.
- 55 • Tatham, M.H., Geoffroy, M., C, Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E., G., Palvimo, J., J., Hay R., T. 2008. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol.* 10(5):538-46.
- Yeh, E. T. 2009. SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J. Biol. Chem.* 284, 8223-8227.
- 60 • Wilkinson K., A. y Henley. J., M. 2010. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem. J.* 428, 133-145.
- Xu J., He Y., Qiang B., Yuan J., Peng, X. y Pan, X. M. 2008. A novel method for high accuracy sumoylation site prediction from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 9,8.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Asociación Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias-CIC BIOGUNE	
5	<120>Trampas de SUMO de alta afinidad	
	<130> PCT-05236	
	<160> 13	
10	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 72	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de TSIM1 o SUBE1	
20	<400> 1	
	<b>gatcttaaac tgctggagat gaaattgtgg acctcacttg tgaatcttta gagcctgtgg</b>	<b>60</b>
	<b>tggttgatct gg</b>	<b>72</b>
25	<210> 2	
	<211> 75	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador inverso de TSIM1 o SUBE1	
	<400> 2	
	<b>gatcccagat caaccaccac aggctctaaa gattcacaag tgagggtccac aatttcatca</b>	<b>60</b>
35	<b>tctccagcag tttca</b>	<b>75</b>
	<210> 3	
	<211> 72	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de TSIM1 o SUBE1	
45	<400> 3	
	<b>gatctggcgg tggaggaggc ggtgggattg tggacctcgg tggaggcggg gggggtggcg</b>	<b>60</b>
	<b>tggttgatct gg</b>	<b>72</b>
	<210> 4	
50	<211> 72	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador inverso de TSIM2 o SUBE2	
	<400> 4	

ES 2 525 573 T3

**gatcccagat caaccacgcc accccctccg cctccaccga ggtccacaat cccaaccgct 60**  
**cctccaccgc ca 72**

5 <210> 5  
 <211> 5058  
 <212> ADN  
 <213> vector modificado PGEX-6P1

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (258)..(918)  
 <223> Glutación-S-transferasa (GST)

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (951)..(968)  
 <223> cola His6

20 <220>  
 <221> exón  
 <222> (1002)..(1043)  
 <223> epitopo Sv5

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1456)..(2314)  
 <223> Resistencia a ampicilina

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3407)..(4487)  
 <223> lacI<sup>q</sup>

<400> 5

**acggttatcga ctgcacgggtg caccaatgct tctggcgctca ggcagccatc ggaagctgtg 60**  
**gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc gcaactcccgt 120**  
**tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc tgaaatgagc 180**  
**tgttgacaat taatcatcgg ctogtataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca 240**  
**cacaggaaac agtattcatg tcccctatac taggttattg gaaaattaag ggccttgtgc 300**  
**aacccaactcg acttcttttg gaatatcttg aagaaaaata tgaagagcat ttgtatgagc 360**  
**gcgatgaag tgateaatgg cgaacaacaaa agtttgaatt gggtttgag tttoccaatc 420**  
**ttccttatta tattgatggt gatgttaaat taacacagtc tatggccatc atacgttata 480**  
**tagctgacaa gcacaacatg ttgggtggt gtccaaaaga gcgtgcagag atttcaatgc 540**  
**ttgaaggagc ggttttggat attagatacg gtgtttcgag aattgcatat agtaaagact 600**  
**ttgaaactct caaagttgat tttcttagca agctacctga aatgctgaaa atgttcgaag 660**  
**atcgtttatg tcataaaaca tattttaaag gtgatcatgt aaccatcct gacttcatgt 720**

35



ES 2 525 573 T3

tgtatgacgc tcttgatggt gttttataca tggacceaat gtgcctggat gcgttcccaa	780
aattagtttg ttttaaaaaa cgtattgaag ctatcccaca aattgataag tacttgaaat	840
ccagcaagta tatagcatgg cctttgcagg gctggcaagc cacgtttggg ggtggcgacc	900
atcctccaaa atcggatctg gaagtctgt tccaggggoc cctgggatct catcaccatc	960
accatcacgg atccccggaa ttccccgggg tcgacctcga g gga aag cca ata cct	1016
	Gly Lys Pro Ile Pro
	1 5
aat cca cta ctt gga cta gaa tcc aca tagggggcgg caatcgtgac	1063
Asn Pro Leu Leu Gly Leu Glu Ser Thr	
	10
tgactgacga tctgcctcgc gcgtttcggg gatgacggtg aaaacctctg acacatgcag	1123
ctccccgaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggtatgcc ggagcagaca agccccgcag	1183
ggcgcgctcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca tgacctcagc acgtagcgat	1243
agcggagtgt ataattcttg aagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt	1303
aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aatgtgcgc	1363
ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa	1423
taaccctgat aatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc	1483
cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa	1543
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa	1603
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttogcc cogaagaacg tttccaatg	1663
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgcgggcaa	1723
gagcaactcg gtgcgccat acaactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	1783
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	1843
atgagtgata acaactgccc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	1903
accgcttttt tgacacaacat ggggatcat gtaactcgc ttgatcgttg ggaaccggag	1963
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccctgcagc aatggcaaca	2023
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttccccgca acaattaata	2083
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggtggc	2143
tggtttattg ctgataaatc tggagccggg gagcgtgggt ctgcgggtat cattgcagca	2203
ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtccggca	2263
actatggatg aacgaaatag acagatcgtc gagataggtg cctcactgat taagcattgg	2323
taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa	2383
tttaaaagga totaggtgaa gatccftttt gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt	2443
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat	2503

ES 2 525 573 T3

cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg 2563  
 gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga 2623  
 ggcgagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac 2683  
 tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt 2743  
 ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag 2803  
 cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc 2863  
 gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag 2923  
 gcggacaggt atccgtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagctcca 2983  
 ggggaaacg cctggtatct ttatagtctt gtccgggttc gccacctctg acttgagcgt 3043  
 cgatttttgt gatgctcgtc aggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 3103  
 tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc 3163  
 cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgcccagc 3223  
 cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgcct gatgcggtat 3283  
 tttctcctta cgcattctgt cggatattca caccgcataa attccgacac catcgaatgg 3343  
 tgcaaaacct ttccggtat ggcattgatg ccccgggaag agagtcaatt cagggtggtg 3403  
 aatgtgaaac cagtaacggt atacgatgct gcagagtatg ccggtgtctc ttatcagacc 3463  
 gtttcccgcg tgggtaacca ggccagccac gtttctgcga aaacgcggga aaaagtggaa 3523  
 gcggcgatgg cggagctgaa ttacattccc aaccgcgtgg cacaacaact ggccggcaaa 3583  
 cagtccgttc tgattggcgt tgccacctcc agtctggccc tgcacgcgcc gtcgcaaatt 3643  
 gtcgcccgga ttaaactctg ccgcatcaa ctgggtgcca gcgtgggtgt gtcgatggtg 3703  
 gaacgaagcg gcgtcgaagc ctgtaaagcg gcggtgcaca atcttctcgc gcaacgcgtc 3763  
 agtgggctga tcattaacta tccgctggat gaccaggatg ccattgctgt ggaagctgcc 3823  
 tgcactaatg ttccggcgtt atttcttgat gtctctgacc agacacccat caacagtatt 3883  
 attttctccc atgaagacgg tacgcgactg ggcgtggagc atctggctgc attggtcac 3943  
 cagcaaatcg cgctgttagc gggcccatta agttctgtct cggcgcgtct gcgtctggct 4003  
 ggtggcata aatatctcac tcgcaatcaa attcagccga tagcggaacg ggaaggcagc 4063  
 tggagtgccg tgcgggttt tcaacaaacc atgcaaatgc tgaatgaggg catcgttccc 4123  
 actgcgatgc tgggtgcca cgatcagatg gcgctgggcg caatgcgcgc cattaccgag 4183  
 tccgggctgc gcgttggtgc ggatatctcg gtagtgggat acgacgatac cgaagacagc 4243  
 tcatgttata tcccgcctc aaccaccatc aaacaggatt ttcgcctgct ggggcaaac 4303  
 agcgtggacc gcttctgca actctctcag ggccaggcgg tgaagggcaa tcagctgttg 4363

ES 2 525 573 T3

**ccggtctcac tggtgaaaag aaaaaccacc ctggcgccca atacgcaaac cgctctccc 4423**  
**cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg 4483**  
**cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca 4543**  
**ctttatgctt cgggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 4603**  
**aaacagctat gaccatgatt acggattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg 4663**  
**aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc 4723**  
**gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg 4783**  
**aatggcgctt tgcctggttt ccggcaccag aagcggtgcc ggaaagctgg ctggagtgcg 4843**  
**atcttcctga ggccgatact gtcgtcgtcc cctcaaactg gcagatgcac ggttacgatg 4903**  
**cgcccatcta caccaacgta acctatccca ttacgggtcaa tccgccgttt gttcccacgg 4963**  
**agaatccgac gggttgttac tcgctcacat ttaatgttga tgaaagctgg ctacaggaag 5023**  
**gccagacgcg aattatTTTT gatggcgttg gaatt 5058**

5 <210> 6  
 <211> 288  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(288)  
 <223> TSIM1 o SUBE1  
  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(24)  
 <223> enlazador natural de RNF4  
  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25)..(36)  
 <223> dominio SIM2  
  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(60)  
 <223> enlazador natural de RNF4  
  
 30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (61)..(72)  
 <223> dominio SIM3  
  
 35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (79)..(96)  
 <223> enlazador natural de RNF4  
  
 40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (97)..(108)  
 <223> dominio SIM2  
  
 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (109)..(132)  
 <223> enlazador natural de RNF4

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (133)..(144)  
 <223> dominio SIM3

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (151)..(168)  
 <223> enlazador natural de RNF4

15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (169)..(180)  
 <223> dominio SIM2

20

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (181)..(204)  
 <223> enlazador natural de RNF4

25

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (205)..(216)  
 <223> dominio SIM3

30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (223)..(240)  
 <223> enlazador natural de RNF4

35

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (241)..(253)  
 <223> Dominio SIM2

40

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (253)..(276)  
 <223> enlazador natural RNF4

45

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (277)..(288)  
 <223> dominio SIM3

50

<400> 6

ES 2 525 573 T3

```

gga tct gaa act gct gga gat gaa att gtg gac ctc act tgt gaa tct      48
Gly Ser Glu Thr Ala Gly Asp Glu Ile Val Asp Leu Thr Cys Glu Ser
1           5           10           15

tta gag cct gtg gtg gtt gat ctg gga tct gaa act gct gga gat gaa      96
Leu Glu Pro Val Val Val Asp Leu Gly Ser Glu Thr Ala Gly Asp Glu
          20           25           30

att gtg gac ctc act tgt gaa tct tta gag cct gtg gtg gtt gat ctg      144

Ile Val Asp Leu Thr Cys Glu Ser Leu Glu Pro Val Val Val Asp Leu
          35           40           45

gga tct gaa act gct gga gat gaa att gtg gac ctc act tgt gaa tct      192
Gly Ser Glu Thr Ala Gly Asp Glu Ile Val Asp Leu Thr Cys Glu Ser
50           55           60

tta gag cct gtg gtg gtt gat ctg gga tct gaa act gct gga gat gaa      240
Leu Glu Pro Val Val Val Asp Leu Gly Ser Glu Thr Ala Gly Asp Glu
65           70           75           80

att gtg gac ctc act tgt gaa tct tta gag cct gtg gtg gtt gat ctg      288
Ile Val Asp Leu Thr Cys Glu Ser Leu Glu Pro Val Val Val Asp Leu
          85           90           95

```

<210> 7  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

5

```

Gly Ser Glu Thr Ala Gly Asp Glu Ile Val Asp Leu Thr Cys Glu Ser
1           5           10           15

Leu Glu Pro Val Val Val Asp Leu Gly Ser Glu Thr Ala Gly Asp Glu
          20           25           30

Ile Val Asp Leu Thr Cys Glu Ser Leu Glu Pro Val Val Val Asp Leu
          35           40           45

Gly Ser Glu Thr Ala Gly Asp Glu Ile Val Asp Leu Thr Cys Glu Ser
50           55           60

Leu Glu Pro Val Val Val Asp Leu Gly Ser Glu Thr Ala Gly Asp Glu
65           70           75           80

Ile Val Asp Leu Thr Cys Glu Ser Leu Glu Pro Val Val Val Asp Leu
          85           90           95

```

10

<210> 8  
 <211> 288  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15

<220>  
 <221> CDS

- <222> (1)..(288)  
<223> TSIM2 o SUBE2
- 5     <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (7)..(27)  
      <223> Enlazador artificial de poliglicina
- 10    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (28)..(29)  
      <223> dominio SIM2
- 15    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (40)..(57)  
      <223> Enlazador artificial de poliglicina
- 20    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (58)..(72)  
      <223> dominio SIM3
- 25    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (79)..(99)  
      <223> Enlazador artificial de poliglicina
- 30    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (100)..(111)  
      <223> dominio SIM2
- 35    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (112)..(129)  
      <223> Enlazador artificial de poliglicina
- 40    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (130)..(144)  
      <223> dominio SIM3
- 45    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (151)..(171)  
      <223> Enlazador artificial de poliglicina
- 50    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (172)..(183)  
      <223> dominio SIM2
- 55    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (184)..(204)  
      <223> Enlazador artificial de poliglicina
- 60    <220>  
      <221> misc\_feature  
      <222> (205)..(216)  
      <223> dominio SIM3
- 65    <220>  
      <221> misc\_feature

<222> (216).. (236)  
 <223> Enlazador artificial de poliglicina

5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (223).. (243)  
 <223> Enlazador artificial de poliglicina

10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (237)..(248)  
 <223> dominio SIM3

15  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (244)..(255)  
 <223> dominio SIM2

20  
 <400> 8

1	gga tct ggc ggt gga gga ggc ggt ggg att gtg gac ctc ggt gga ggc Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Asp Leu Gly Gly Gly	48
	5 10 15	
	gga ggg ggt gtc gtg gtt gat ctg gga tct ggc ggt gga gga ggc ggt Gly Gly Gly Val Val Val Asp Leu Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly	96
	20 25 30	
	ggg att gtg gac ctc ggt gga ggc gga ggg ggt gtc gtg gtt gat ctg Gly Ile Val Asp Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val Val Val Asp Leu	144
	35 40 45	
	gga tct ggc ggt gga gga ggc ggt ggg att gtg gac ctc ggt gga ggc Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Asp Leu Gly Gly Gly	192
	50 55 60	
	gga ggg ggt gtc gtg gtt gat ctg gga tct ggc ggt gga gga ggc ggt Gly Gly Gly Val Val Val Asp Leu Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly	240
	65 70 75 80	
	ggg att gtg gac ctc ggt gga ggc gga ggg ggt gtc gtg gtt gat ctg Gly Ile Val Asp Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val Val Val Asp Leu	288
	85 90 95	

25  
 <210> 9  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 525 573 T3

**Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Asp Leu Gly Gly Gly**  
**1 5 10 15**  
**Gly Gly Gly Val Val Val Asp Leu Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly**  
**20 25 30**  
**Gly Ile Val Asp Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val Val Val Asp Leu**  
**35 40 45**  
**Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Asp Leu Gly Gly Gly**  
**50 55 60**  
**Gly Gly Gly Val Val Val Asp Leu Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly**  
**65 70 75 80**  
**Gly Ile Val Asp Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val Val Val Asp Leu**  
**85 90 95**

5 <210> 10  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(12)  
 <223> dominio SIM2

<400> 10

15 **att gtg gac ctc**  
**Ile Val Asp Leu**  
**1**

12

20 <210> 11  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

25 **Ile Val Asp Leu**  
**1**

30 <210> 12  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

35 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(12)  
 <223> dominio SIM3

<400> 12



**gtg gtt gat ctg**  
**Val Val Asp Leu**  
**1**

**12**

5  
<210> 13  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 13

10  
**Val Val Asp Leu**  
**1**

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido que comprende al menos ocho motivos de interacción con SUMO (SIM), en el que dichos motivos de interacción con SUMO se unen entre sí por una secuencia enlazadora de aminoácidos natural.
2. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los motivos de interacción con SUMO se organizan en tándem y se eligen de los presentes en una proteína seleccionada de: PML, Daxx, UBA2, PIAS, ligasa RNF4 y/o variantes funcionalmente equivalentes de las mismas.
- 10 3. Polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en el que los motivos de interacción con SUMO se seleccionan del grupo que comprende: SIM1, SIM2, SIM3, SIM4 y/o combinaciones de los mismos.
4. Polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polipéptido comprende cuatro motivos SIM3 y cuatro SIM3 y/o variantes funcionalmente equivalentes de los mismos.
- 15 5. Polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 representado por SEC ID NO: 7.
6. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el aislamiento *in vitro* y/o *ex vivo* de proteínas SUMOiladas y/o para la identificación de los sustratos de SUMO.
- 20 7. Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
8. Secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 7, representada por SEC ID NO: 6.
- 25 9. Una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
10. Vector que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, o una construcción génica de acuerdo con la reivindicación 9.
- 30 11. Una célula que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, o una construcción génica de acuerdo con la reivindicación 9, o un vector de acuerdo con la reivindicación 10.
- 35 12. Un animal no humano que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, o una construcción génica de acuerdo con la reivindicación 9, o un vector de acuerdo con la reivindicación 10, o una célula de acuerdo con la reivindicación 11.
- 40 13. Un proceso para obtener un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 5, que comprende cultivar una célula de acuerdo con la reivindicación 11 en condiciones que permitan producir dicho polipéptido y, si se desea, recuperar dicho polipéptido del medio de cultivo.
- 45 14. Un método *in vitro* para el aislamiento de una proteína SUMOilada de una muestra que comprende
- i) incubar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 con dicha muestra en condiciones que permitan que dicho polipéptido interactúe con al menos una proteína SUMOilada presente en dicha muestra; y
- ii) recuperar cualquier proteína SUMOilada que se una a dicho polipéptido.
- 50 15. Un kit que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5.



Figura 2

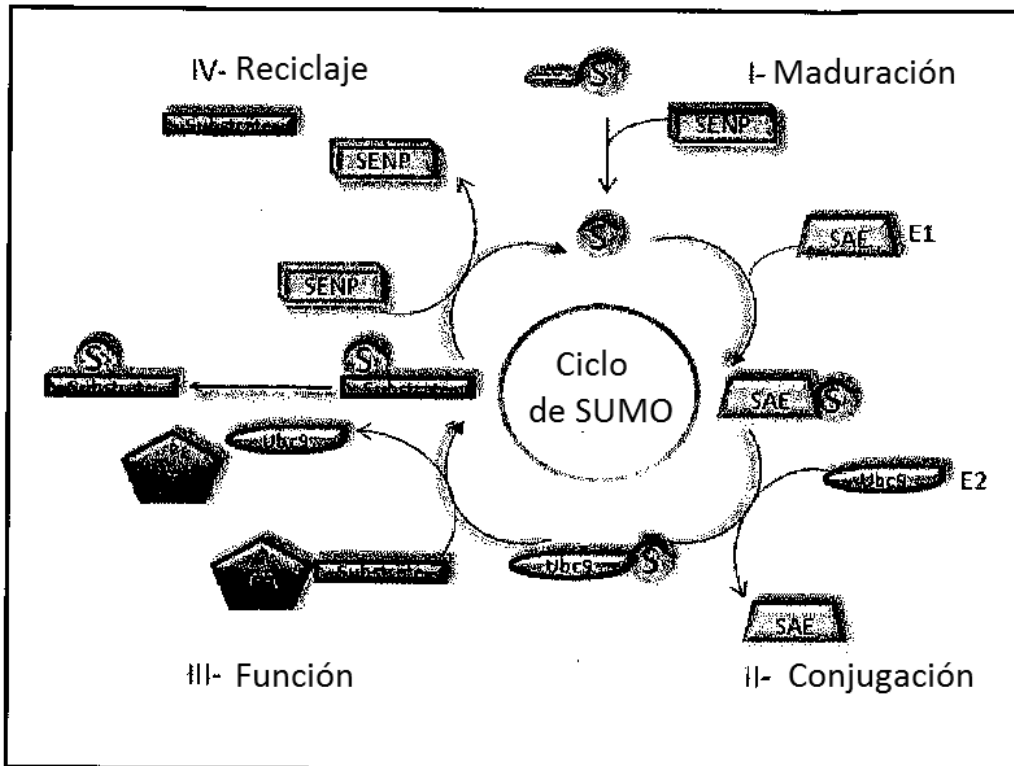
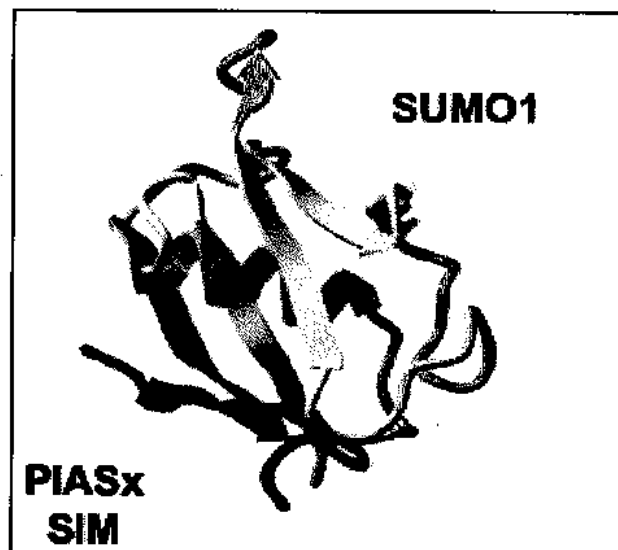


Figura 3



**Figura 4**

**TSIM 1 (RNF4)**

G S E T A G D E I V D L T C E S L E P V V V D L  
 5'- GGA TCT GAA ACT GCT GGA GAT GAA ATT GTG GAC CTC ACT TGT GAA TCT TTA GAG CCT GTG GTG GTT GAT CTG

G S E T A G D E I V D L T C E S L E P V V V D L  
 GGA.TCT.GAA.ACT.GCT.GGA.GAT.GAA.ATT.GTG.GAC.CTC.ACT.TGT.GAA.TCT.TTA.GAG.CCT.GTG.GTG.GTT.GAT.CTG

G S E T A G D E I V D L T C E S L E P V V V D L  
 GGA.TCT.GAA.ACT.GCT.GGA.GAT.GAA.ATT.GTG.GAC.CTC.ACT.TGT.GAA.TCT.TTA.GAG.CCT.GTG.GTG.GTT.GAT.CTG

G S E T A G D E I V D L T C E S L E P V V V D L  
 GGA.TCT.GAA.ACT.GCT.GGA.GAT.GAA.ATT.GTG.GAC.CTC.ACT.TGT.GAA.TCT.TTA.GAG.CCT.GTG.GTG.GTT.GAT.CTG G-3'

**TSIM 2 (RNF4 sintético)**

G S G G G G G G I V D L G G G G G G V V D L  
 5'- GGA TCT GGC GGT GGA GGA GGC GGT GGG ATT GTG GAC CTC GGT GGA GGC GGA GGG GGT GTC GTG GTT GAT CTG

G S G G G G G G I V D L G G G G G G V V D L  
 GGA.TCT.GGC.GGT.GGA.GGA.GGC.GGT.GGG.ATT.GTG.GAC.CTC.GGT.GGA.GGC.GGA.GGG.GGT.GTC.GTG.GTT.GAT.CTG

G S G G G G G G I V D L G G G G G G V V D L  
 GGA.TCT.GGC.GGT.GGA.GGA.GGC.GGT.GGG.ATT.GTG.GAC.CTC.GGT.GGA.GGC.GGA.GGG.GGT.GTC.GTG.GTT.GAT.CTG

G S G G G G G G I V D L G G G G G G V V D L  
 GGA.TCT.GGC.GGT.GGA.GGA.GGC.GGT.GGG.ATT.GTG.GAC.CTC.GGT.GGA.GGC.GGA.GGG.GGT.GTC.GTG.GTT.GAT.CTG G-3'

Figura 5

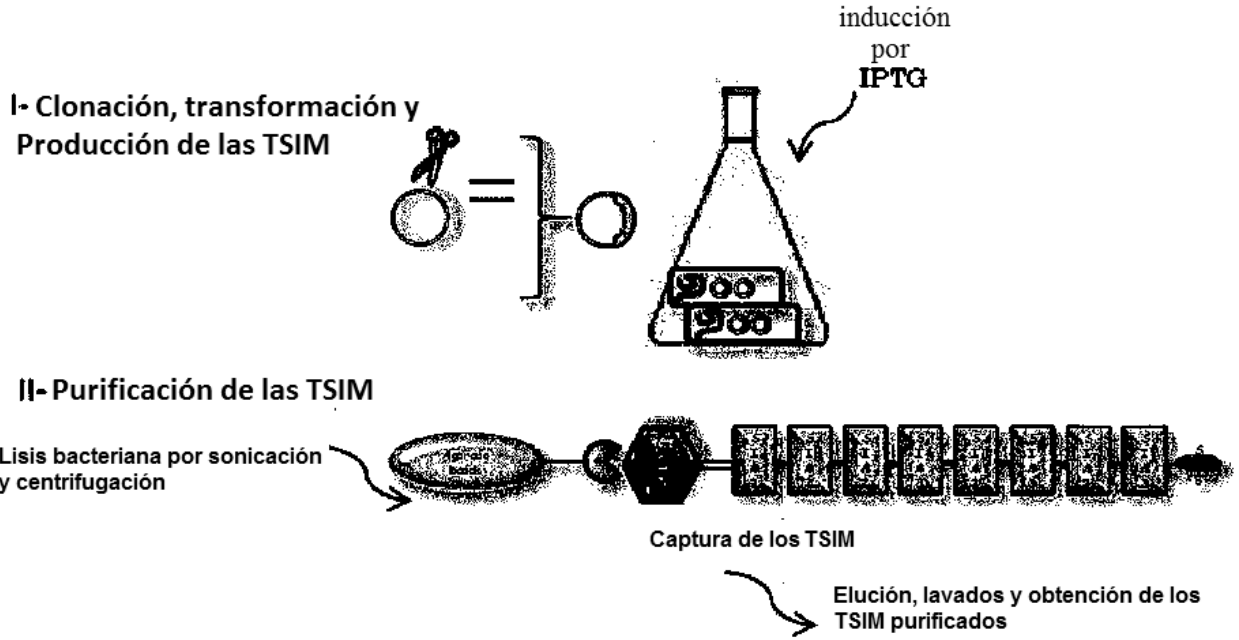


Figura 6

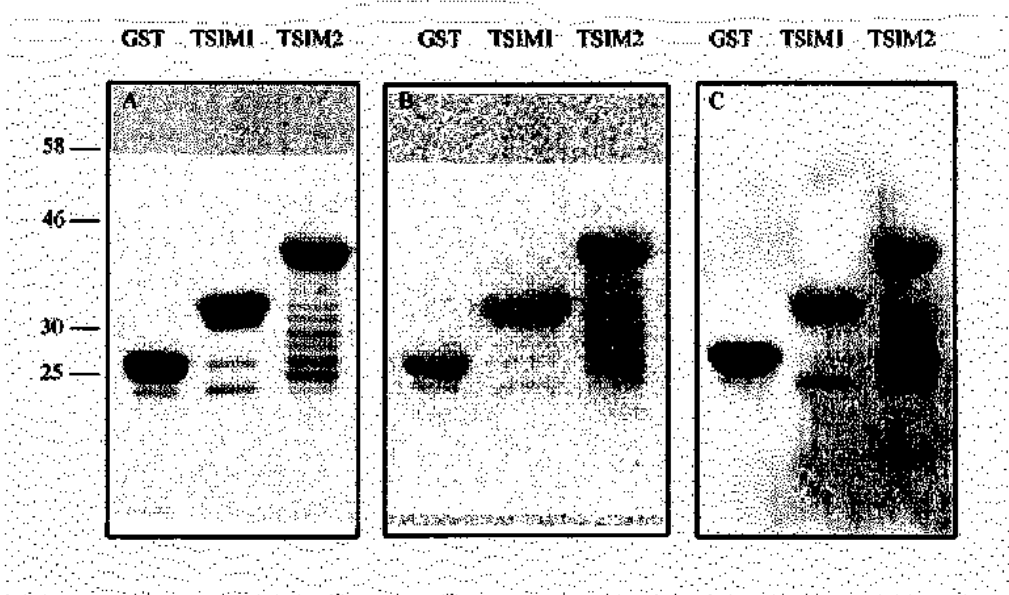


Figura 7

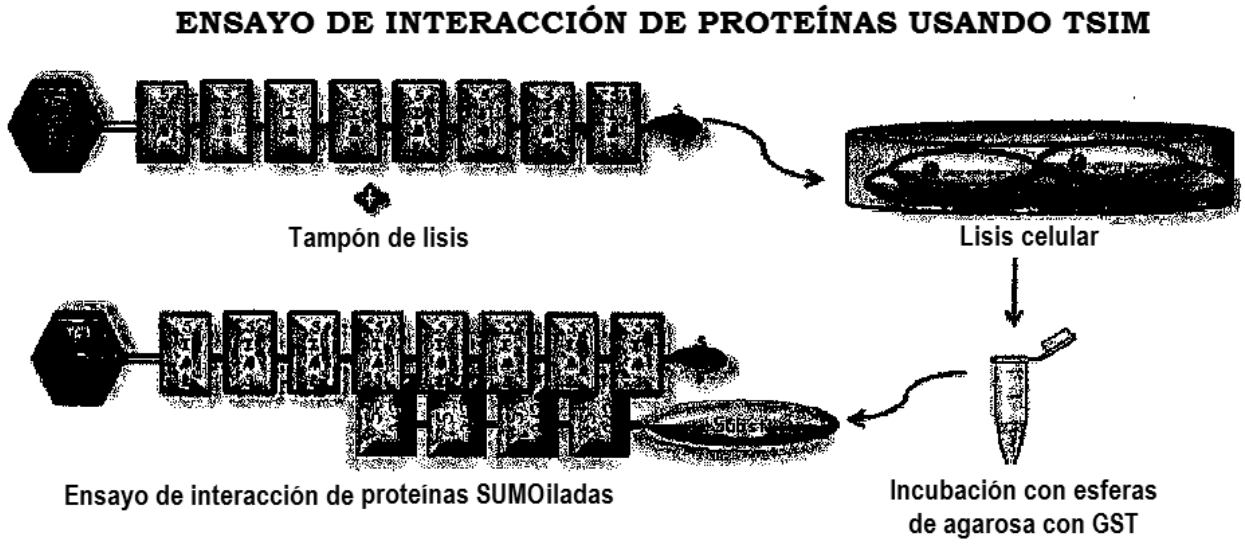


Figura 8

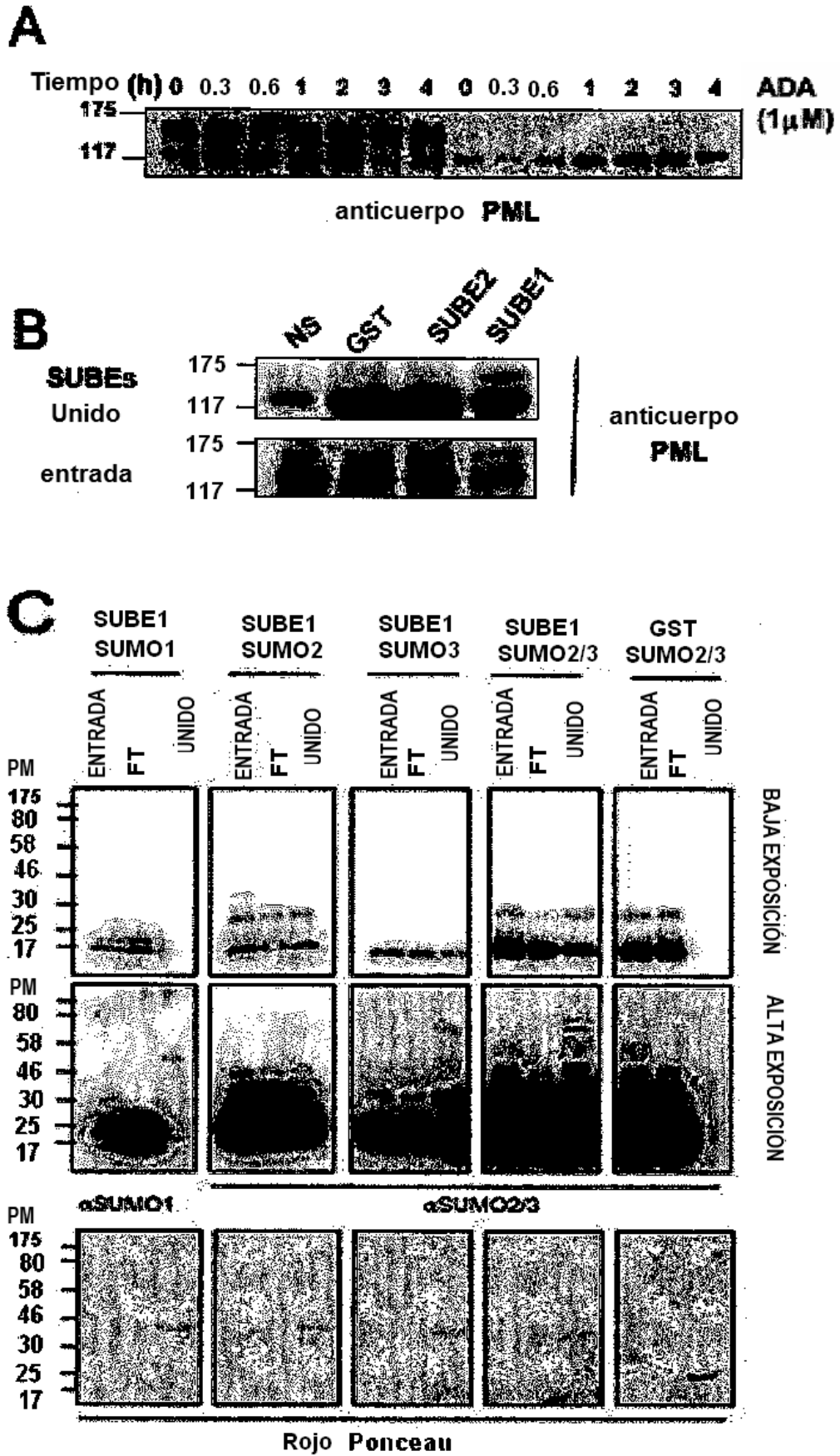
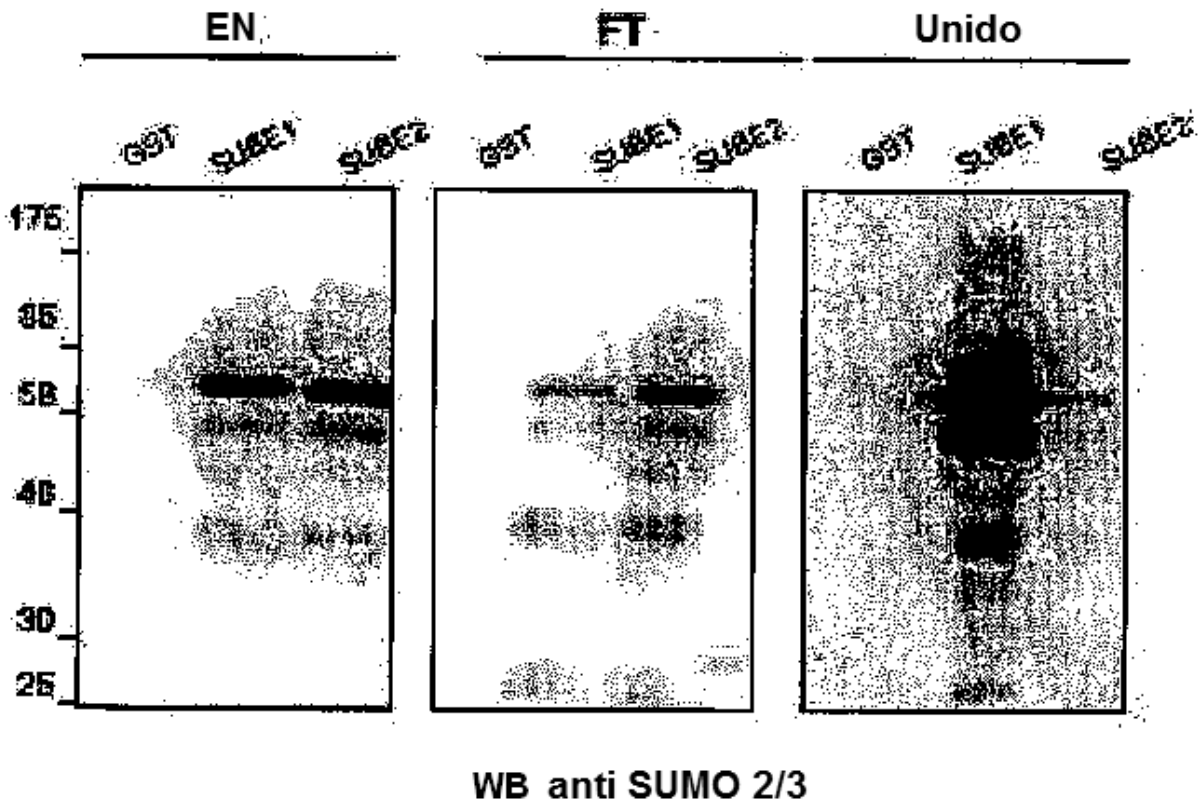




Figura 9

**A** Ensayo de interacción con GST



**B** RESONANCIA DE PLASMONES DE SUPERFICIE

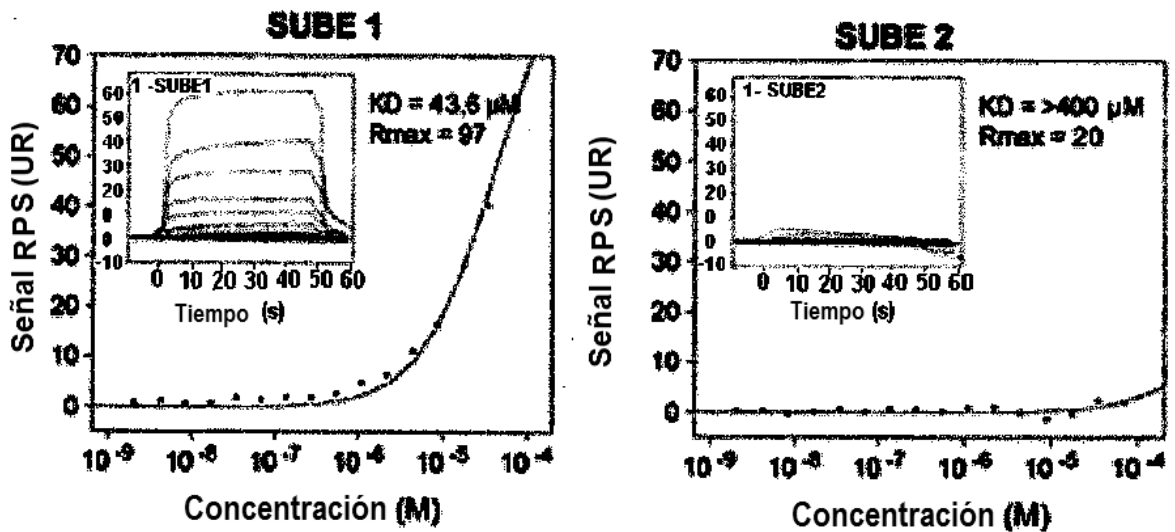


Figura 10

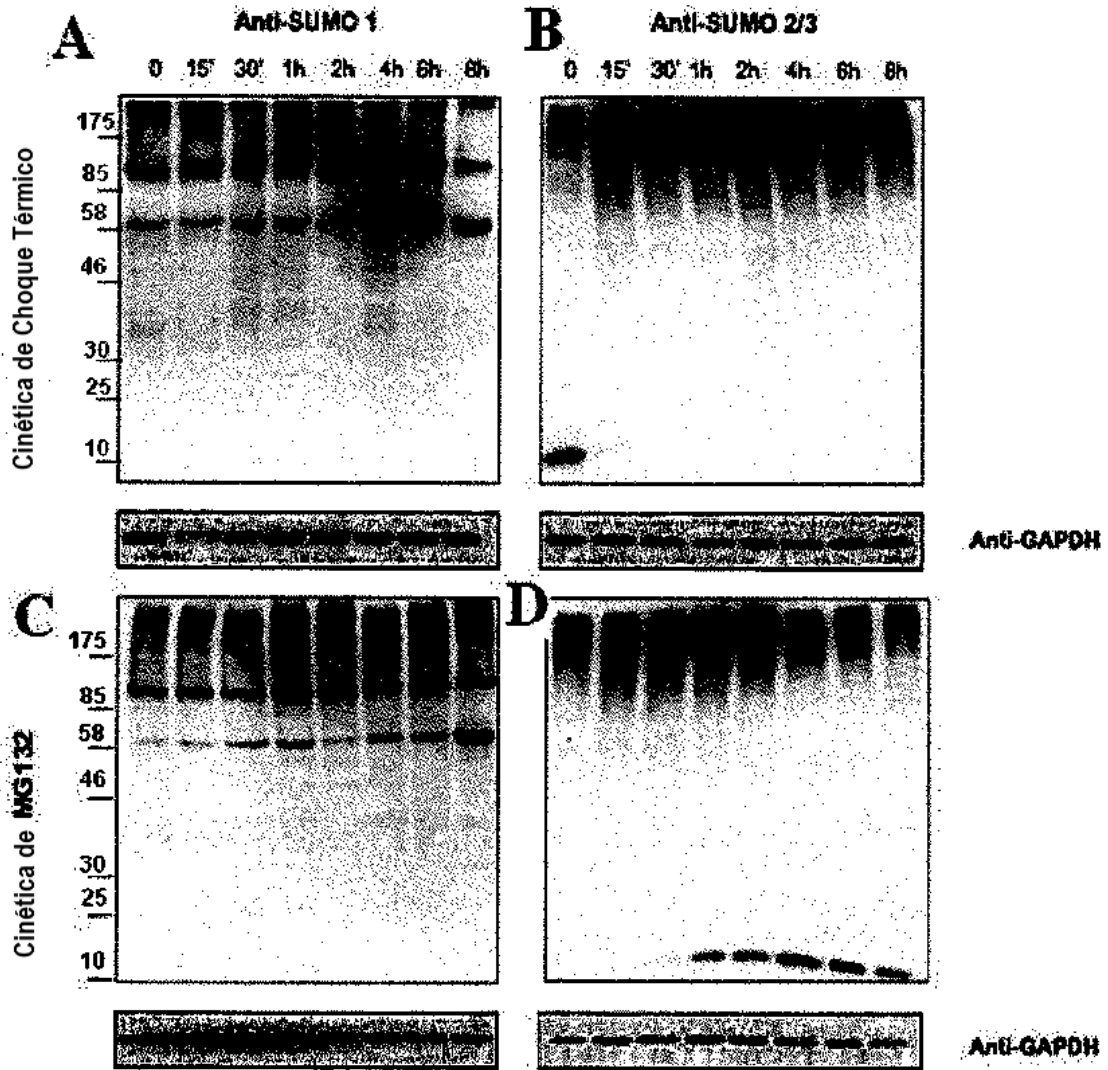


Figura 11

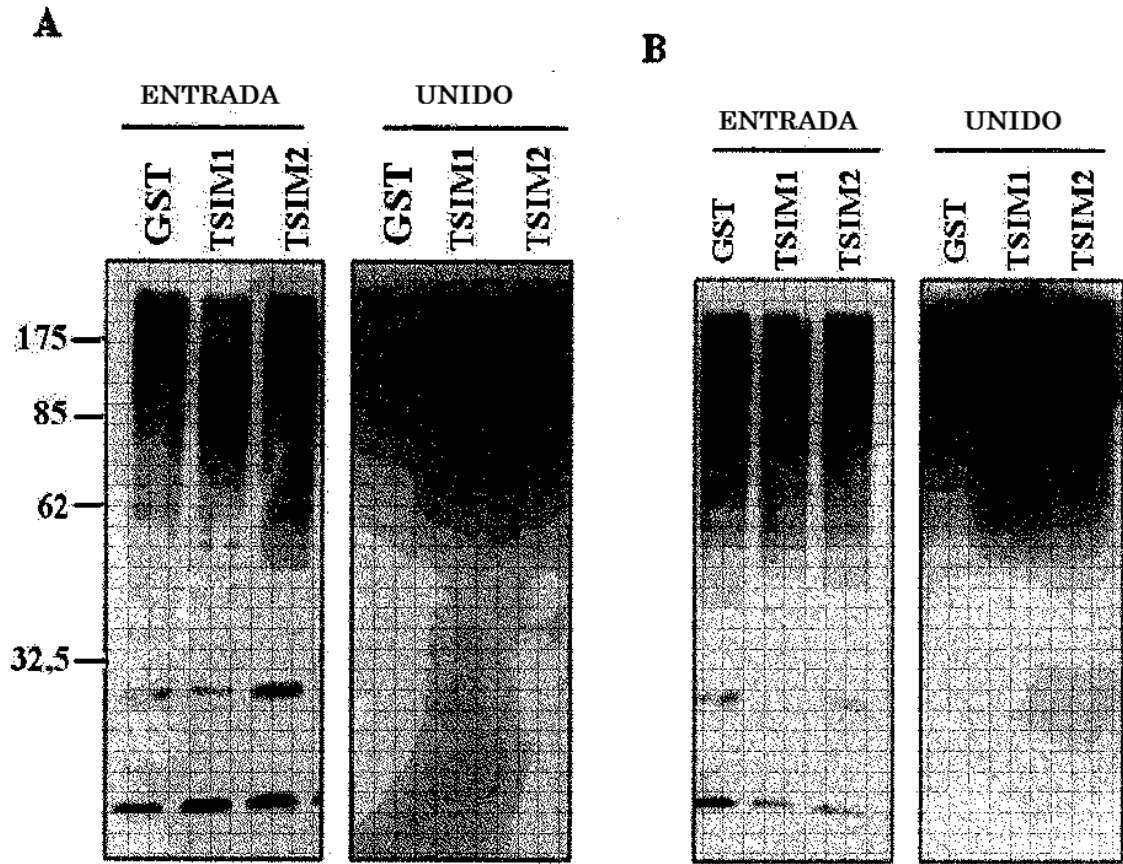
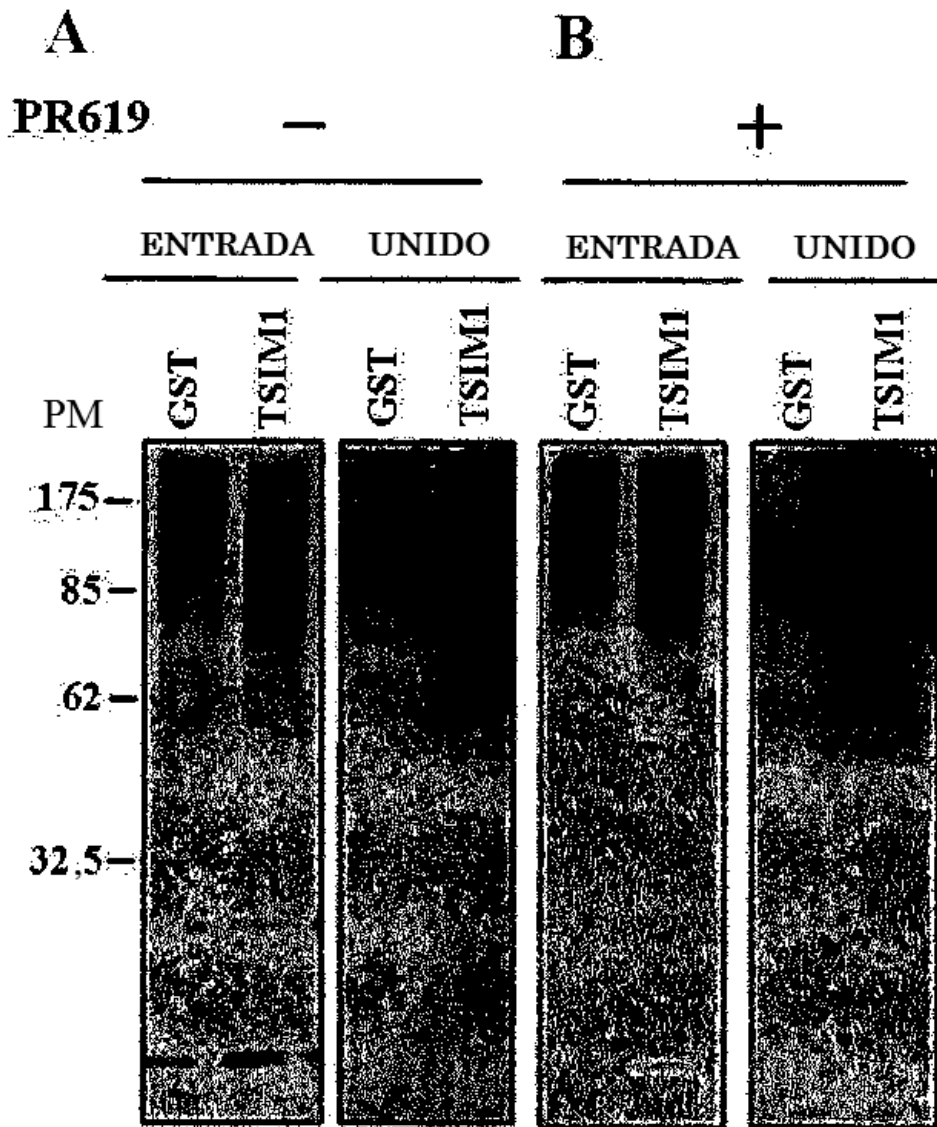


Figura 12



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- US 6103489 A [0040]
- WO 9005785 A [0041]
- WO 2006135436 A [0051]
- WO 2006012221 A [0051]
- WO 0406514 A [0062]

10

**Literatura no patente citada en la descripción**

- **ALTSCHUL, S. et al.** BLAST Manual. 1990 [0039]
- **ALTSCHUL, S. et al.** BLAST Manual. 1990 [0048]
- **ALTSCHUL SF ; GISH W ; MILLER W ; MYERS EW ; LIPMAN DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, 1990, vol. 215 (3), 403-10 [0078]
- **BERNIER-VILLAMOR V. ; SAMPSON D. A. ; MATUNIS M. J. ; LIMA C. D.** Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*, 2002, vol. 108, 345-356 [0078]
- **BRUDERER R ; TATHAM MH ; PLECHANOVOVA A ; MATIC I ; GARG AK ; HAY RT.** Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates. *EMBO Rep.*, February 2011, vol. 12 (2), 142-8 [0078]
- **GEISS-FRIEDLANDER R. ; MELCHIOR F.** *Concepts in SUMOylation: a decade on Nature reviews molecular cell biology*, 2007, vol. 8, 947-956 [0078]
- **GOLEBIOWSKI F. ; MATIC I. ; TATHAM M., H. ; COLE V. ; YIN Y. ; NAKAMURA A. ; COX J. ; BARTON G., J. ; MANN M. ; HAY R.T.** System-Wide Changes to SUMO Modifications in Response to Heat Shock. *Sci. Signal.*, 2009, vol. 2 (72), 24 [0078]
- **HECKER C. M. ; RABILLER M. ; HAGLUND K. ; BAYER P. ; DIKIC I.** Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, 16117-16127 [0078]
- **HAY R.** SUMO: A History of Modification. *Molecular Cell*, 2005, vol. 18, 1-12 [0078]
- **HAYASHI T. ; SEKI M. ; MAEDA D. ; WANG W. ; KAWABE Y. ; SEKI T.** Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp. Cell Res.*, 2002, vol. 280, 212-221 [0078]
- **JOHNSON E. S.** Protein modification by SUMO. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, vol. 73, 355-382 [0078]
- **KAGEY M.H. ; MELHUIST T.A. ; WOTTON D.** The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*, 2003, vol. 113, 127-137 [0078]
- **KAHYO T. ; NISHIDA T. ; YASUDA H.** Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol. Cell*, 2001, vol. 8 (3), 713-8 [0078]
- **KERSCHER O. ; FELBERBAUM R. ; HOCHSTRASSER M.** Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2006, vol. 22, 159-180 [0078]
- **LAPENTA, V. ; CHIURAZZI, P. ; VAN DER SPEK, P. ; PIZZUTI, A. ; HANAOKA, F. ; BRAHE, C.** SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics*, 1997, vol. 40, 362-366 [0078]
- **MATUNIS, M. J. ; COUTAVAS, E. ; BLOBEL, G.** A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.*, 1996, vol. 135, 1457-1470 [0078]
- **MAHAJAN, R. ; DELPHIN, C. ; GUAN, T. ; GERACE, L. ; MELCHIOR, F.** A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 1997, vol. 88, 97-107 [0078]
- Sumoylation as a Signal for Polyubiquitylation and Proteasomal Degradation. **MITEVA M. ; KEUSEKOTTEN K. ; HOFMANN K. ; PRAEFCKE G. ; JÜRGEN DOHMEN R.** Bookshelf ID: NBK25447 Conjugation and Deconjugation of Ubiquitin Family Modifiers. 2010, 195-214 [0078]
- **RODRIGUEZ MS ; DESTERRO JM ; LAIN S ; MIDGLEY CA ; LANE DP ; HAY RT.** SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J.*, 15 November 1999, vol. 18 (22), 6455-61 [0078]
- **RODRIGUEZ M. S. ; DARGEMONT C. ; HAY R. T.** SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 12654-12659 [0078]
- **SAMBROOK J. ; MACCALLUM P.** Molecular cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, vol. 1-3 [0078]

- **SAITOH H ; HINCHEY J.** Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, 6252-6258 [0078]
- **SAMPSON DA ; WANG M ; MATUNIS MJ.** The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem.*, 2001, vol. 276 (24), 21664-9 [0078]
- **SEUFERT, W. ; FUTCHER, B. ; JENTSCH, S.** Role of ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature*, 1995, vol. 373, 78-81 [0078]
- **SEELER, J., S. ; DEJEAN, A.** Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2003, vol. 9, 690-9 [0078]
- **SCHMIDT, D ; MULLER, S.** Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, vol. 99, 2872-2877 [0078]
- **SONG, J. ; DURRIN, L. K. ; WILKINSON, T. A. ; KRONIRIS, T. G. ; CHEN, Y.** Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, 14373-14378 [0078]
- **TATHAM M.H. ; JAFFRAY E. ; VAUGHAN O.A. ; DESTERRO J.M. ; BOTTING C.H ; NAISMITH J.H. ; HAY R.T.** Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 35368-35374 [0078]
- **TATHAM, M.,H. ; GEOFFROY, M.,C. ; SHEN, L. ; PLECHANOVOVA, A. ; HATTERSLEY, N. ; JAFFRAY, E.,G. ; PALVIMO, J.,J. ; HAY R.,T.** RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol.*, 2008, vol. 10 (5), 538-46 [0078]
- **YEH, E. T.** SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, 8223-8227 [0078]
- **WILKINSON K., A. ; HENLEY. J., M.** Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem. J.*, 2010, vol. 428, 133-145 [0078]
- **XU J. ; HE Y. ; QIANG B. ; YUAN J. ; PENG, X. ; PAN, X. M.** A novel method for high accuracy sumoylation site prediction from protein sequences. *BMC Bioinformatics*, 2008, vol. 9, 8 [0078]