

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 525**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2015 PCT/EP2015/066650**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16012451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2015 E 15738940 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3172563**

54 Título: **Métodos para detectar interacciones en células eucariotas usando estructuras y dinámica de microtúbulos**

30 Prioridad:

23.07.2014 EP 14306190

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

31.01.2020

73 Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR y

UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE (50.0%)

72 Inventor/es:

PASTRE, DAVID;

CAILLERET, MICHEL;

CURMI, PATRICK y

BOCA, MIRELA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 739 525 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

Métodos para detectar interacciones en células eucariotas usando estructuras y dinámica de microtúbulos

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos y usos para estudiar interacciones de ligandos en una célula eucariota.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La función de un número de proteínas sigue siendo imprecisa, lo que ralentiza la comprensión de aspectos fundamentales de los mecanismos celulares, e impide el avance en el diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades y en medicina personalizada. Uno de los principales obstáculos para entender mejor una función dada de una proteína es que las proteínas interactúan generalmente con muchas otras parejas (proteínas, ácidos nucleicos, azúcares, lípidos, etc.), y muchas de estas interacciones son débiles y transitorias, a pesar de la importancia crítica.

Se ha desarrollado una serie de métodos para proporcionar una vista mejor sobre la interacción de proteínas (Lowder et al., Visualizing protein partnerships in living cells and organisms. *Curr Opin Chem Biol* 15, 781-788, 2011), entre ellos los ensayos de inmunoprecipitación, sistemas de dos híbridos, y variantes como los sistemas de complementación del sustrato, la transferencia de energía por fluorescencia (FRET) o técnicas relacionadas. El documento WO 00/50872 enseña métodos para detectar la estabilidad de los microtúbulos intracelulares. El documento US 2007/106066 enseña complejos terapéuticos de proteína-anticuerpo.

Un procedimiento típico adoptado por los científicos es aprovechar la elevada capacidad de producción del sistema de dos híbridos, generalmente en levadura, para obtener una lista exhaustiva de parejas potenciales para una proteína de interés, y después controlar si las interacciones propuestas también son detectadas con uno de los otros dos métodos (ensayos de inmunoprecipitación o la FRET).

Cada uno de estos métodos sufre numerosos inconvenientes. Los ensayos de inmunoprecipitación requieren la lisis celular (Paul et al., Analyzing protein-protein interactions by quantitative mass spectrometry. *Methods* 54, 387-395, 2011), anticuerpos específicos y la adsorción sobre sustratos no fisiológicos, conduciendo a falsos positivos y falsos negativos. Además, la información obtenida no refleja necesariamente lo que puede ocurrir en células vivas, y lo más grave, estos métodos detectan interacciones fuertes, incluso aunque se han realizado algunas mejoras en este punto (Lee et al., Real-time single-molecule coimmunoprecipitation of weak protein-protein interactions. *Nat Protoc* 8, 2045-2060, 2013) (Jain et al., Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down. *Nature* 473, 484-488, 2011). Los sistemas de dos híbridos pueden detectar interacciones proteicas en células vivas, pero requieren dos o más proteínas quiméricas, y son incapaces de monitorizar sucesos bioquímicos rápidos que tienen lugar en las células (Lievens et al., Mammalian two-hybrids come of age. *Trends Biochem Sci* 34, 579-588, 2009). Además, no se detectan las interacciones débiles y transitorias. FRET también puede detectar interacciones proteicas en células vivas, pero la señal de FRET depende fuertemente de la distancia y la orientación de los marcadores dadores y aceptores colocados en las proteínas cebo y diana, respectivamente. La detección de interacciones débiles también es un reto, debido a la baja relación de señal a ruido (Lam et al., Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 9, 1005-1012, 2012). Además, cuando el cebo y la presa interactúan entre sí, pero el dador está muy separado del aceptor (> 4-5 nm), la señal de FRET es débil.

En el documento WO 2013087921A1 se enseñan además proteínas fluorescentes manipuladas adecuadas para FRET, tales como pares de proteínas fluorescentes dadoras yceptoras. Se han desarrollado para células eucariotas otras alternativas al sistema de dos híbridos de levadura, pero distintas de FRET.

El documento US 7244614B2 enseña proteínas de fusión recombinantes para detectar la unión de una molécula de interés, que comprende un dominio de detección, un dominio de unión, y un dominio de localización, tal como una Señal de Localización Nuclear (NLS) o una Señal de Exportación Nuclear (NES).

El documento WO 2000017221A1 se refiere a un método para medir interacciones de proteína-proteína en células vivas, usando un primer conjugado heterólogo con un grupo detectable, y un segundo conjugado heterólogo que se une a una estructura interna en dichas células. Según el documento WO 2000017221A1, una "estructura interna" incluye cualquier componente celular distribuido no uniformemente, incluyendo, por ejemplo, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, y derivados de los mismos.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de nuevos métodos y herramientas adecuados para detectar interacciones débiles y transitorias entre ligandos en células vivas.

También sigue existiendo la necesidad de tales métodos que, al mismo tiempo, sigan siendo adecuados para el cribado de alto rendimiento.

También sigue existiendo la necesidad de métodos que proporcionen condiciones adecuadas y fisiológicas en el contexto de una célula viva, y que también sigan siendo adecuados para la detección de interacciones de ligandos

en tiempo real.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a métodos para identificar parejas de ligandos, tales como proteínas, en una célula eucariota, y más particularmente en un contexto de célula eucariota viva. El sistema consiste en un sistema de detección fácil basado en la expresión en células de (i) un "cebo", una proteína conocida, que se lleva a los microtúbulos gracias a su fusión a un dominio de unión a microtúbulos, y (ii) una presa, que puede ser, por ejemplo, una proteína/polipéptido o un ácido nucleico.

10 Sorprendentemente, se ha encontrado que la presa, cuando interacciona con el cebo, también se localiza a lo largo de los microtúbulos, lo que la hace así fácilmente detectable. La invención presenta las siguientes ventajas: (i) un sistema de detección de parejas de proteínas de alta sensibilidad que se puede automatizar y que de este modo es adecuado para métodos de alto rendimiento; (ii) la detección de la interacción cebo/presa se lleva a cabo en un entorno de célula viva, lo que preserva de cualesquiera modificaciones post-traduccionales de las parejas.

De este modo, la invención se refiere a métodos para detectar en una célula eucariota una interacción entre uno o más cebos proteicos y una o más presas candidatas.

15 La invención también se refiere al uso de un resto de unión a tubulina polimerizada, tal como un dominio de unión a microtúbulos (MBD), fusionado a uno o más cebos, como una herramienta para determinar la aparición de una interacción entre dicho uno o más cebos y una o más presas candidatas en una célula eucariota. La invención se refiere además a cebos proteicos, vectores, estirpes celulares, y kits adecuados para dichos métodos y usos.

20 De este modo, un primer aspecto de la invención es proporcionar un método para detectar una interacción entre uno o más cebos proteicos y una o más presas candidatas en una célula eucariota, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una célula eucariota que expresa (i) uno o más cebos proteicos, y (ii) una o más presas candidatas, en la que dicho cebo proteico comprende un resto de cebo y un resto de unión a tubulina polimerizada,
- 25 b) determinar la aparición de una interacción entre el mencionado uno o más cebos proteicos y la mencionada una o más presas candidatas en la célula eucariota, en el que el mencionado cebo proteico está unido a tubulina polimerizada en la célula eucariota. Dicho cebo proteico está unido a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha interacción.

30 Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de un resto de unión a tubulina polimerizada fusionado a uno o más cebos, como herramienta para determinar la aparición de una interacción entre dicho uno o más cebos y una o más presas candidatas en una célula eucariota. Dicho cebo proteico está unido a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha interacción.

35 También se describe aquí un cebo proteico que comprende un resto de unión a tubulina polimerizada que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos, y un resto de cebo.

Se describe también aquí un vector que contiene un casete de expresión adecuado para expresar un cebo proteico de la invención.

También se describen aquí estirpes celulares que se transfectan con un vector de la invención, y/o que expresan de forma estable un cebo proteico adecuado para los métodos y usos de la invención.

40 También se describen aquí kits para detectar en una célula una interacción de uno o más cebos proteicos con una o más presas candidatas, que comprenden un cebo proteico, un vector, y/o una estirpe celular adecuada para los métodos y usos de la invención.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

45 Figura 1: Principio del método: análisis de alto rendimiento y sistema de detección. Aplicación a una interacción de ARNm endógeno con YB-1, una proteína de unión a ARNm. (A) Células cultivadas en microplacas se transfectan mediante un sistema automatizado. (B) Tras la adquisición de imágenes, la identificación de un "patrón similar a microtúbulos" en el canal de fluorescencia que corresponde a la presa (ARN mensajero) certifica la interacción entre el cebo (YB-1-GFP-tau) y la presa (ARNm). (C) (*Panel superior; de izquierda a derecha*) detección del cebo: YB-1-GFP-Tau; detección de la presa: ARNm; ejemplo de la
50 detección de una interacción proteína-ARN que muestra la presencia de un patrón similar a microtúbulos en el canal de Cy3 (que corresponde a la sonda marcada con Cy3 de ARN de poli-T para detectar ARNm). (*Panel inferior*) YB-1-GFP se usa como control y se distribuye homogéneamente en el citoplasma.

Figura 2: Principio del método para células fijadas y para una presa endógena. Detección de una presa

endógena llevada a microtúbulos, en dos etapas. Una primera etapa (Etapa 1) incluye la transfección de un vector de expresión que codifica un cebo proteico que comprende un dominio de unión a microtúbulos y opcionalmente un marcador fluorescente. Una segunda etapa (Etapa 2) incluye la detección de la presa endógena usando reactivos tales como anticuerpos dirigidos contra la presa nativa, o hibridación con ácidos nucleicos. La presa se detecta entonces en los microtúbulos tras su interacción con el cebo.

Figura 3: Principio del método para células vivas y para una presa exógena. Una primera etapa (Etapa 1) incluye la cotransfección de dos vectores de expresión; un primer plásmido expresa un cebo proteico que comprende un dominio de unión a microtúbulos y opcionalmente un marcador fluorescente. Un segundo plásmido expresa la presa exógena marcada opcionalmente con un marcador fluorescente. Una segunda etapa (Etapa 2) incluye la detección de la presa exógena a lo largo de los microtúbulos dinámicos o en el citoplasma usando un marcador fluorescente específico para la presa y/o un anticuerpo.

Figura 4: Interacción proteína-proteína (autoatracción de YB-1) detectada usando el método en células fijadas. (A) Células NRK se transfectan con un plásmido que codifica YB-1-GFP que muestra la distribución aleatoria de esta proteína en el citoplasma. (B) Células NRK se cotransfectan con plásmidos que codifican YB-1-tau (cebo) y YB-1-GFP (presa). Se sabe que YB-1 es una proteína autoatrayente, y YB-1-GFP es llevada a los microtúbulos debido a su unión al cebo. Panel izquierdo: visualización con un anti-YB-1. Panel central: visualización de YB-1 GFP sola. Panel derecho: vista próxima de la unión de los microtúbulos al cebo del panel central.

Figura 5: YB-1 no interactúa con TIA-1 en células fijadas. (Panel izquierdo) células NRK se transfectan con un plásmido que codifica YB-1-GFP-tau. (Panel derecho) la localización de TIA-1 se sondea usando un anticuerpo anti-TIA-1 específico. No se observa interacción entre el cebo y TIA-1. Esto es un control negativo.

Figura 6: Detección de la unión a eIF2B de eIF2A fosforilada en células HeLa. Se transfectaron células con un plásmido que codifica eIF2B-tau (cebo) y eIF2a-GFP (presa), en las siguientes condiciones. (A) Control: eIF2A-GFP no interacciona significativamente con eIF2B-tau. (B) Tras el estrés (arsenito 0,5 mM durante 45 minutos), eIF2A se fosforila, lo que conduce a una interacción con eIF2B-tau (localizada en los microtúbulos). Las estructuras microtubulares se pueden detectar fácilmente. (C) Transferencia Western de células NRK tras el tratamiento con arsenito, que muestra la fosforilación de eIF2A (anti-eIF2A). Anti-tubulina (control de carga).

Figura 7: Formación de imágenes mediante microscopía por vídeo de YB-1-GFP llevada a los microtúbulos debido a su unión a YB-1-tau en células NRK vivas. Los movimientos de los microtúbulos se pueden observar (véanse las flechas) a lo largo del tiempo (de izquierda a derecha: T = 0 s; 10 s; 20 s), que mejora la sensibilidad de la detección, tras la eliminación del fondo mediante formación de imágenes diferencial.

Figura 8: Formación de imágenes mediante microscopía por vídeo de eIF2A-GFP llevada a los microtúbulos debido a su unión a eIF2B tras el estrés con arsenito en células HeLa. El tratamiento con arsenito desencadena la fosforilación de eIF2A-GFP, y de este modo, su unión a eIF2B. Los microtúbulos se detectan indirectamente (véase la flecha en la imagen de mayor aumento).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos para detectar una interacción entre uno o más cebos proteicos y una o más presas candidatas en una célula eucariota.

Según la invención, un “cebo proteico” comprende al menos un “resto de cebo” y al menos un “resto de unión a tubulina polimerizada”.

Según una realización, dicho “cebo proteico” comprende al menos un “resto de cebo” y al menos un “resto de unión a tubulina polimerizada” que no proceden de una misma proteína de origen natural.

Según la invención, la expresión “que comprende” o “comprende” también incluye “que consiste en” o “consistente en”.

Un “resto de cebo” es un resto que tiene tendencia a interactuar con una o más presas candidatas en la célula.

Un “resto de unión a tubulina polimerizada” comprende un péptido, una proteína, o una nucleoproteína que tiene la capacidad para unirse específicamente a tubulina polimerizada. Preferiblemente, el “resto de unión a tubulina polimerizada” se une con mayor especificidad a tubulina en su forma polimérica que a tubulina en su forma no polimérica, que incluye su forma monomérica y/o su forma heterodímera (que corresponde al heterodímero de alfa/beta tubulina). De forma ideal, un resto de unión a tubulina polimerizada se une mayoritariamente, o incluso exclusivamente, a tubulina polimerizada, que incluye microtúbulos.

Los microtúbulos son un componente del citoesqueleto, encontrados a lo largo del citoplasma. Los microtúbulos son parte de la red estructural (el “citoesqueleto”) en el citoplasma de la célula. El papel principal del citoesqueleto de

microtúbulos es el soporte mecánico, aunque los microtúbulos también intervienen en muchos otros procesos. De este modo, los microtúbulos son solamente parte del denominado "citoesqueleto de microtúbulos", debido a que este último incluye además proteínas asociadas, tales como Proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), junto con otras estructuras organizadoras tales como los centrómeros.

5 "Tubulina polimerizada" se refiere exclusivamente al ensamblaje de tubulina monomérica, o como alternativa, al ensamblaje de heterodímeros de tubulina, de manera normal y con una polaridad distinta.

Los polímeros tubulares de tubulina pueden crecer tanto como 50 micrómetros, con una longitud promedio de 25 μm , y son muy dinámicos. El diámetro exterior de un microtúbulo es generalmente de alrededor de 24-25 nm, mientras que el diámetro interior es de alrededor de 12 nm. Se encuentran en células eucariotas, y se forman por la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares, α -tubulina y β -tubulina. De este modo, la expresión "tubulina polimerizada" engloba los microtúbulos.

De este modo, los "microtúbulos" representan un reordenamiento particular de "tubulina polimerizada", que se produce fisiológicamente en células eucariotas, y que forma con parejas adicionales el "citoesqueleto de microtúbulos". El ensamblaje fisiológico de los microtúbulos generalmente se describe de manera que comprende una primera etapa de ensamblaje regulado de heterodímeros de alfa-tubulina y beta-tubulina, que juntos forman un protofilamento polarizado. Después, se cree que los protofilamentos se ensamblan, como un cilindro, en el denominado microtúbulo. De este modo, los microtúbulos se describen generalmente como polímeros de dímeros de α - y β -tubulina, que están compuestos de 13 protofilamentos ensamblados alrededor de un núcleo hueco. Sin embargo, se ha de señalar que los denominados microtúbulos con un número diferente de protofilamentos también han sido descritos en la técnica, tales como los microtúbulos con 14 o 15 protofilamentos. Sin embargo, el significado fisiológico de tales variaciones, o "transiciones de protofilamentos", sigue siendo poco claro.

El experto en la técnica sabe que la tubulina es uno de varios miembros de una familia pequeña de proteínas globulares. La superfamilia de tubulina incluye cinco familias distintas, las alfa-, beta-, gamma-, delta-, y epsilon-tubulinas, y una sexta familia (zeta-tubulina) que está presente solamente en protozoos cinetoplastos. Los miembros más comunes de la familia de tubulina son alfa-tubulina (α -tubulina) y beta-tubulina (β -tubulina), las proteínas que constituyen los microtúbulos. El final del microtúbulo, que corresponde a beta-tubulina, se denomina el extremo más. El extremo del microtúbulo, que corresponde a alfa-tubulina, se denomina el extremo menos.

De este modo, un "resto de unión a tubulina polimerizada" de la invención puede incluir un resto de unión a alfa-tubulina y/o a beta-tubulina, y/o combinaciones de los mismos, y se une preferiblemente a tubulina en su forma polimérica en vez de en su forma monomérica o en su forma heterodímera.

Como se sabe en la técnica, la "forma heterodímera" de la tubulina corresponde al heterodímero de alfa/beta tubulina. De este modo, la forma polimérica de la tubulina también corresponde a un polímero de heterodímeros, que también corresponde a más de un heterodímero de alfa/beta tubulina.

Por referencia, la alfa-tubulina humana tiene la secuencia SEQ ID N°7.

35 Por referencia, la beta-tubulina humana tiene la secuencia SEQ ID N°8.

Sin desear estar atados por la teoría, los inventores son de la opinión de que la tubulina polimerizada, y más particularmente la superficie de los microtúbulos, es una plataforma activa única que proporciona propiedades previamente irreconocibles para cribar interacciones de ligandos en una célula eucariota.

En primer lugar, los microtúbulos ofrecen una gran superficie en la célula debido a sus dimensiones (25 nm de diámetro y decenas de micrómetros de longitud). Si consideramos un centenar de microtúbulos de 10 μm de longitud en células de mamífero típicas como células HeLa, la superficie de los microtúbulos es mayor que 30 μm^2 , e incluso puede ser mayor en células como neuronas o células musculares. De este modo, tal gran superficie está disponible para la unión de un número enorme de cebos sin saturación (si el cebo requiere una superficie de interacción tan grande como 10 nm^2 en los microtúbulos, virtualmente se pueden anclar teóricamente a los microtúbulos más de 3000000 de copias de cebo por célula). Esto es significativamente mayor que el número típico de proteínas sobreexpresadas en células de mamífero transfectadas (alrededor de 100000 copias es ya una gran sobreexpresión para la mayoría de las proteínas).

Una segunda ventaja de usar la superficie de microtúbulos reside en su comportamiento dinámico. Los microtúbulos son intrínsecamente muy dinámicos, y alternan permanentemente entre fases de acortamiento y de crecimiento. Este comportamiento permite disociar el cebo de los microtúbulos durante la fase de despolimerización y unirlo a otro microtúbulo o tras la repolimerización del microtúbulo. Durante ese intervalo de tiempo, el cebo se aleja de los microtúbulos y entonces es capaz de capturar presas que están situadas en el citoplasma a granel y no en la vecindad de los microtúbulos. Para ese fin, también se pueden usar fármacos que alteran los microtúbulos o despolimerizan los microtúbulos, tales como nocodazol, vinblastina, vincristina, colchicina, colcemida, podofilotoxina, rizoxina o vinorelbina.

Los cebos se pueden hacer volver a los microtúbulos usando un resto de unión a tubulina polimerizada fusionado, tal

como Proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), incluyendo tau (secuencia de referencia de NCBI: NP_005901.2), o Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD).

5 Según una realización, el anclaje del cebo es debido a la repetición de los Dominios de Unión a los Microtúbulos presentes generalmente en MAPs. Estas repeticiones tienen una afinidad elevada por los microtúbulos en comparación con la tubulina libre, el bloque constructor de los microtúbulos, y usando este método solo una porción muy pequeña estará libre en el citoplasma celular.

Cuando la presa interacciona con el cebo llevado a los microtúbulos, su relocalización en la superficie de los microtúbulos permite su detección vía la aparición de estructuras microtubulares en la imagen fluorescente de la presa.

10 Desde hace tiempo se sabe que la detección de estructuras filamentosas, tales como “patrones similares a microtúbulos”, es muy sensible, y consiste en extrapolar una línea recta en la imagen de fluorescencia de manera que la señal se pueda detectar sin un ruido distribuido homogéneamente. Este principio general se usa rutinariamente para formar imágenes de microtúbulos mediante microscopía de fluorescencia moteada (para un repaso, véase Salmon & Waterman; How we discovered fluorescent speckle microscopy; Mol Biol Cell, 3940-2; 15 2011).

Sin embargo, este método de detección fácil no sería posible en una estructura más globular u otro sustrato definido incorrectamente. Los métodos de la invención también son posibles con el análisis de datos en tiempo real de las imágenes fluorescentes de células vivas, y de este modo se pueden implementar para detectar mejor el cebo unido a los microtúbulos en células vivas. El hecho es que los microtúbulos se mueven con el tiempo debido a sus estructuras muy dinámicas, lo que mejora adicionalmente su detección lejos del gran fondo fluorescente para la detección en células vivas.

Por todas estas razones, la elección de los microtúbulos es muy relevante, incluso en comparación con otros tipos de filamentos. Puesto que la interacción entre el cebo y la presa se puede observar en tiempo real, las interacciones transitorias que suceden, por ejemplo, tras la modificación post-traducciona, como sucesos de fosforilación, se pueden observar en tiempo real.

Tal método es también particularmente eficiente para estudiar el efecto de las mutaciones en la interacción de un cebo dado con una presa candidata.

En otras palabras, se propone ahora que la tubulina polimerizada, y por extensión los restos de unión a tubulina polimerizada, se pueden usar como herramientas para detectar una interacción entre uno o más cebos proteicos y una o más presas candidatas en una célula eucariota. De este modo, esto representa un “cambio del paradigma” puesto que se sabía mayoritariamente que los microtúbulos, hasta ahora, eran un objeto de estudio en sí mismos, pero no como una herramienta para detectar interacciones de ligandos en una célula eucariota.

Debido a que se basa en la estructura de los microtúbulos en células fijadas o vivas y en la dinámica de los microtúbulos en células vivas, este método también representa una alternativa a los dos métodos usados ampliamente para sondas interacciones de proteínas en células vivas: (i) FRET entre un dador fusionado a un cebo y un aceptor fusionado a la presa, y (ii) el sistema de dos híbridos que se basa en la complementación de fragmentos o en proteínas fusionadas al cebo y a la presa cuya reconstitución genera una señal cuantificable (por ejemplo, ensayo de β -galactosidasa):

(i) comparado con FRET, este método es más fácil de manipular, debido a que simplemente se tiene que cotransfectar la célula y observar si aparecen o no los microtúbulos tras la transfección de las células, usando la señal de fluorescencia de la presa. Nuestro esquema de detección es independiente de la distancia entre la presa y el cebo, y la señal fluorescente detectada a lo largo de los microtúbulos es directamente proporcional a la cantidad de presa que interacciona con el cebo y los microtúbulos. La detección de FRET es más exigente, puesto que tanto la distancia entre los marcadores fluorescentes como su orientación relativa cuando interaccionan la presa y el cebo modulan fuertemente la intensidad de la señal de FRET. Esta es la razón por la que está limitada la aplicación generalizada de FRET. Como resultado, a menudo se requiere una optimización caso por caso. Además, es necesaria una experimentación muy costosa y una buena experiencia para la detección de la señal de FRET. La BIFC (complementación fluorescente bimolecular) alternativa no puede permitir el análisis de la interacción dinámica, y carece de la posibilidad de que la interacción entre el cebo y la presa sufra un sesgo por complementación estable.

(ii) El sistema de dos híbridos, y especialmente la técnica de dos híbridos de levadura (Y2H), es el método más ampliamente usado debido a su alto rendimiento para cartografiar interacciones estáticas. Sin embargo, en comparación con ensayos de dos híbridos, nuestro método permite la detección de interacciones de proteínas en tiempo real, y de este modo permite capturar la plasticidad de las interacciones de proteínas. El contexto fisiológico en el que tienen lugar las interacciones también es cuestionable en los experimentos de Y2H, lo que no es el caso en los métodos reivindicados. A ese respecto, el método de la invención puede ser complementario a Y2H, puesto que puede descifrar fácilmente si el cebo y la presa interaccionan o no en células de mamíferos. El rendimiento elevado también se puede implementar usando el método reivindicado,

5 como en Y2H, puesto que se pueden analizar matrices de muestras celulares mediante microscopía por vídeo para células vivas, o mediante microscopía clásica para células fijadas. Por último, en el método de Y2H, tanto el cebo como la presa están fusionados a las proteínas de adaptación necesarias, que entonces pueden coalescer para formar un complejo funcional. En nuestros métodos, la presa puede estar libre (detección con anticuerpo en células fijadas), marcada con una etiqueta no fluorescente pequeña, como FLAG o V5, o una etiqueta fluorescente simple, como GFP, usada para experimentos con células vivas.

Los métodos y usos de la invención se han validado adicionalmente, como se muestra a partir de los ejemplos. De forma breve, se ha diseñado un plásmido para dirigir la expresión de una proteína conocida (cebo) fusionada a la proteína tau vía su dominio N-terminal (extremo del dominio de proyección de tau) en células de mamífero.

10 Tras fusionarla a tau, se llevaron con éxito dos cebos a los microtúbulos: eIF2B (subunidad épsilon del factor de iniciación de la traducción eIF-2B; número de acceso: NP_003898.2), un factor de iniciación de la traducción, e YB-1 (proteína 1 de unión al elemento sensible a nucleasa, o proteína de unión a la caja Y; número de acceso: NP_004550.2), una proteína de unión a ARNm, se detectaron ambos fácilmente a lo largo de los microtúbulos mediante microscopía óptica en células NRK o HeLa (células epiteliales de rata normales y células de cáncer humanas, respectivamente).

15 En células vivas, el análisis de fluorescencia mediante microscopía por vídeo usando como cebo YB-1 marcada con GFP o eIF2B reveló la interacción de YB-1 con sí misma, así como la unión de eIF2A a eIF2B, pero solo después del tratamiento con arsenito, que induce la fosforilación de eIF2A (número de acceso: NP_114414.2). Esto es una prueba de que el método es perfectamente adecuado para estudiar el efecto de las modificaciones post-traduccionales. En el caso de eIF2A (factor 2A de iniciación de la traducción eucariota), su fosforilación es un evento temprano que se produce tras diversos esfuerzos medioambientales en células de mamífero, que conduce a la detención de la traducción. Tal estrategia podría ser útil para la detección de estrés en células vivas (células informadoras).

20 Usando YB-1 como cebo, la hibridación in situ con sondas de poli-T marcadas con cy3 (40 nucleótidos) reveló la presencia de ARNm llevado a los microtúbulos, lo que está de acuerdo con el hecho de que YB-1 es una proteína de unión a ARNm conocida. Por lo tanto, este método es adecuado también para sondar la interacción de proteínas-ARN en el contexto celular, incluyendo miARN, ARNm, ARNr y ARNt.

El "resto de cebo" y la presa candidata pueden ser idénticos o diferentes, y se seleccionan preferiblemente en un grupo que comprende (o que consiste en) una proteína o un ácido nucleico, que incluye nucleoproteínas.

30 De manera no limitativa, un "resto de cebo" y/o una "presa candidata" incluyen cualquier molécula de interés, particularmente proteínas de interés, tales como anticuerpos, proteínas de unión a ácidos nucleicos, y otras diversas proteínas receptoras o péptidos de cebo, principalmente aquellos de relevancia biológica, incluyendo aquellos de relevancia diagnóstica y farmacológica.

35 También incluye ácidos nucleicos, tales como los ARN mensajeros, los ARN codificantes y no codificantes, los ARN de transferencia, los ARN ribosomiales, los ARN interferentes, o los ARN de silenciamiento.

La interacción entre el cebo y la presa se evalúa debido a la interacción del cebo proteico a tubulina polimerizada, mediante un resto de unión a tubulina polimerizada. De este modo, es preferible que dicho resto de cebo no interaccione o se colocalice en absoluto con tubulina polimerizada, o de manera limitada, cuando se compara con el mismo resto conjugado al resto de unión a tubulina polimerizada en condiciones de referencia y/o fisiológicas.

40 Los restos de cebo que se consideran particularmente son restos de cebo cuya distribución es difusa en el citoplasma de la célula eucariota en condiciones de referencia y/o fisiológicas.

Una condición "fisiológica" puede consistir en un montaje experimental en el que la célula eucariota no está en una situación de estrés o apoptosis, que incluye un montaje experimental en el que la célula eucariota no está en contacto con un medio que tiene un pH no fisiológico, o una condición salina.

45 Según algunas realizaciones, el "resto de cebo" es un resto que no interacciona, o se colocaliza, con tubulina polimerizada (o microtúbulos) en la célula eucariota en condiciones de referencia o fisiológicas.

Según una realización ejemplar, un "resto de cebo" es un resto de unión a ácido nucleico, tal como una proteína de unión a ácido nucleico, y una "presa candidata" es un ácido nucleico, tal como un ARN mensajero.

50 Según otra realización, un "resto de cebo" es un anticuerpo o un fragmento del mismo, y una "presa candidata" es una proteína o un péptido que es susceptible a la unión a dicho anticuerpo.

Según otra realización, un "resto de cebo" es un ácido nucleico, tal como un ARN mensajero, y una "presa candidata" es un resto de unión a ácido nucleico, tal como una proteína de unión a ácido nucleico.

Una "presa candidata" puede ser una presa candidata nativa o modificada, homóloga o heteróloga.

El “resto de unión a tubulina polimerizada” se puede escoger idealmente entre anticuerpos conocidos, proteínas de unión a los microtúbulos, o sus fragmentos, que incluyen (de manera no exhaustiva) estabilizantes y desestabilizantes de los microtúbulos, motores moleculares, proteínas que cortan los microtúbulos y proteínas de rastreo del extremo, tales como proteínas de rastreo del extremo más.

5 Como referencia, se proporciona aquí a continuación una lista de proteínas de unión a microtúbulos:

Tabla 1: Lista de proteínas de unión a microtúbulos

Función	Nombre o familia de la proteína
Estabilizantes de los microtúbulos	Familia de MAP1
	Proteína 1A asociada a los microtúbulos
	Proteína 1B asociada a los microtúbulos
	Cadena ligera 3A de las proteínas 1A/1B asociadas a los microtúbulos
	Cadena ligera 3B de las proteínas 1A/1B asociadas a los microtúbulos
	Familia RP/EB de MAP
	Miembro 1 de la familia RP/EB de proteínas asociadas a los microtúbulos
	Miembro 2 de la familia RP/EB de proteínas asociadas a los microtúbulos
	Miembro 3 de la familia RP/EB de proteínas asociadas a los microtúbulos
	Familia de EMAP que contiene la repetición WD
	Proteína 5 asociada al citoesqueleto (Disl/Tog)
	Cadena pesada de ferritina (Sincolina)
	Proteína 1 que contiene el dominio de MAP7
	Proteína 2 asociada a los microtúbulos
	Proteína 4 asociada a los microtúbulos
	Proteína 7 asociada a los microtúbulos
	Proteína tau asociada a los microtúbulos
	STOP (MAP6)
Desestabilizantes	Proteína KIF2A similar a kinesina (Kinesina-2)
	Estatmina (Op18, prosolina, metablastina)
Motores moleculares	Dineínas y dinactina citoplásmicas
	Kinesinas
Corte	Katanina
	Espastina
Proteínas de rastreo del extremo más	Proteínas enlazadoras citoplásmicas (CLIPs) : CLIP-170, CLIP-115, CLIP-190
	Proteínas que se asocian a CLIPs (CLASPs) : CLASP 1, CLASP2, MAST/Orbit
	MCAK (kinesina asociada al centrómero mitótico)
	XMAP215, dCP224

	Proteínas de la familia EB/PR: EB-1, EB-2, EB-3, RP1, Bimlp, Mal3p
	Proteínas enlazadoras citoplásmicas (CLIPs) : CLIP-170, CLIP-115, CLIP-190
	Gefirina

De este modo, el “resto de unión a tubulina polimerizada” se puede escoger entre proteínas de unión a microtúbulos de longitud completa, fragmentos de proteínas de unión a microtúbulos, o incluso Dominios de Unión a Microtúbulos aislados, que se sabe que se unen específicamente a tubulina polimerizada, tales como microtúbulos.

5 El “Dominio de Unión a Microtúbulos” (MBD) se refiere a uno o más fragmentos de una proteína de unión a microtúbulos que son responsables de su unión a tubulina polimerizada, y en particular a los microtúbulos.

Aunque las “Proteínas asociadas a los microtúbulos” (MAP) también pueden ser proteínas de unión a tubulina polimerizada y/o proteínas de unión a microtúbulos, la expresión “Dominio de Unión a Microtúbulos” (MBD) se refiere a un dominio que es capaz de unirse específica y directamente a los microtúbulos. Por las mismas razones, un
10 “resto de unión a tubulina polimerizada” se referirá a un resto que se une específica y directamente a tubulina polimerizada.

De este modo, un MBD puede comprender todas las posibles secuencias de aminoácidos que conducen a la unión de la proteína de unión a microtúbulos a los microtúbulos.

15 Como referencia, un Dominio de Unión a Microtúbulos de la invención puede derivar de la proteína tau, tal como la isoforma 2 de tau (número de acceso: NP_005901.2), que incluye la secuencia SEQ ID N°1, que incluye las secuencias SEQ ID N°11 a 14.

Un Dominio de Unión a Microtúbulos de la invención puede derivar de la proteína MAP1A (número de acceso: NP_002364), que incluye la secuencia SEQ ID N°2.

20 Un Dominio de Unión a Microtúbulos de la invención puede derivar de la proteína MAP2 (número de acceso: NP_002365), que incluye la secuencia SEQ ID N°3.

Un Dominio de Unión a Microtúbulos de la invención puede derivar de la proteína MAP4 (número de acceso: AAA67361), que incluye la secuencia SEQ ID N°4.

Un Dominio de Unión a Microtúbulos de la invención puede derivar de la proteína MAP6 (número de acceso: NP_149052), que incluye la secuencia SEQ ID N°5.

25 Un Dominio de Unión a Microtúbulos de la invención puede derivar de la proteína EB1 (número de acceso: NP_036457), que incluye la secuencia SEQ ID N°6.

De este modo, un Dominio de Unión a Microtúbulos de la invención se puede seleccionar en un grupo que comprende o consiste en: tau de secuencia SEQ ID N°1 y SEQ ID N°10 a 14, MAP1A de secuencia SEQ ID N°2, MAP2 de secuencia SEQ ID N°3, MAP4 de secuencia SEQ ID N°4, MAP6 de secuencia SEQ ID N°5, EB-1 de
30 secuencia SEQ ID N°6, y/o cualquier Dominio de Unión a Microtúbulos que deriva de proteínas asociadas a los microtúbulos, y fragmentos, y combinaciones de los mismos.

En la técnica ya se han dado a conocer métodos para identificar restos de unión a tubulina polimerizada y/o dominios de unión a microtúbulos en una proteína. Véase, como referencia: Cravchik et al.; Identification of a novel microtubule-binding domain in microtubule-associated protein 1A (MAP1A). J Cell Sci, 107 (Pt 3), 661-72, 1994.

35 Aquí más abajo se proporciona adicionalmente un ensayo para determinar la secuencia de Dominios de Unión a Microtúbulos putativos:

El procedimiento propuesto para evaluar si una secuencia de aminoácidos es o no un “Dominio de Unión a Microtúbulos” con una respuesta booleana se basa en la aparición de un patrón similar a microtúbulos mediante
40 microscopía óptica en células que expresan la secuencia de aminoácidos ensayada, usando marcaje directo (etiquetas fluorescentes tales como GFP) o indirecto (anticuerpo).

Por ejemplo, la espastina (acceso: NP 055761), una proteína que corta los microtúbulos, cuando se muta en lisina 388 a arginina (K388R) para evitar el corte de los microtúbulos, se une fuertemente a los microtúbulos. Tal secuencia de aminoácidos se puede considerar como un “dominio de unión a microtúbulos”. Véase como referencia: Errico et al.; Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics, Hum Mol Genet, 11, 153-163, 2002.
45

Los Dominios de Unión a Microtúbulos (MBP) se encuentran a menudo en tándems, y/o como repeticiones. Por

ejemplo, la proteína tau es una proteína asociada a los microtúbulos (MAP) muy soluble, para la cual se han encontrado en seres humanos al menos seis isoformas, y que puede comprender tres o cuatro Dominios de Unión a Microtúbulos en su extremo del término carboxi.

5 Por ejemplo, la isoforma más larga de tau comprende cuatro dominios de unión a microtúbulos putativos (aa: 243-274; 275-305, 306-336 y 337-368. Acceso NP_005901.2), respectivamente de secuencias SEQ ID N°11-14. Sin embargo, las regiones de flanqueo de tau también refuerzan su unión a los microtúbulos. Como referencia, véase: Trinczek et al., Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. Mol Biol Cell, 6(12), 1887-902.

10 De este modo, tales regiones de flanqueo también se pueden incluir como una parte adicional del Dominio de Unión a Microtúbulos, sin separarse del alcance de la invención.

De este modo, un resto de unión a tubulina polimerizada comprende preferiblemente una pluralidad de Dominios de Unión a Microtúbulos, que incluye Dominios de Unión a Microtúbulos en tándems y/o repeticiones, que también incluyen al menos dos, al menos tres, o incluso al menos cuatro Dominios de Unión a Microtúbulos. Estos dominios también pueden estar separados por enlazadores, a fin de mejorar su unión a los microtúbulos.

15 Los Dominios de Unión a Microtúbulos pueden ser iguales o diferentes. En particular, pueden ser parte de la misma proteína de unión a microtúbulos, o de proteínas de unión a microtúbulos diferentes. Preferiblemente, son parte de la misma proteína de unión a microtúbulos.

20 Según una realización ejemplar, un resto de unión a tubulina polimerizada incluye al menos un fragmento de tau que se une a los microtúbulos, que también incluye al menos un Dominios de Unión a Microtúbulos de tau, tal como un MBD de tau de secuencia SEQ ID N°1, SEQ ID N°11, SEQ ID N°12, SEQ ID N°13 y/o SEQ ID N°14, y sus combinaciones.

Métodos y usos para detectar una interacción entre cebo o cebos proteicos y presa o presas candidatas

Se proporciona un método fácil de llevar a cabo para identificar rápidamente interacciones potenciales de proteínas en células eucariotas vivas y fijadas, tales como células de mamífero.

25 En primer lugar, la secuencia de ácido nucleico que codifica el cebo se inserta en un plásmido a fusionar a un dominio de unión a microtúbulos dado. Después, se puede llevar a cabo un cribado con anticuerpos dirigidos contra las parejas endógenas potenciales en células fijadas, o con oligonucleótido complementario para detectar la pareja que interactúa con el ácido nucleico. Esto será de interés para muchos laboratorios interesados en determinar si dos proteínas interactúan o no entre sí con sus anticuerpos comerciales u obtenidos en el laboratorio, o con ácido nucleico con secuencia nucleica dedicada.

30 Tanto en células vivas como fijadas, el plásmido etiquetado con la GFP clásica, que codifica un conjunto dado de presas relevantes para las interacciones investigadas, se puede usar para cribar parejas potenciales de una proteína dada (cebo), y se puede comparar con el control (por ejemplo, solamente proteína tau-GFP).

35 Este método se puede usar complementariamente con técnicas conocidas tales como las técnicas clásicas de dos híbridos de levadura (Y2H) para determinar si los resultados de Y2H no fueron falsos positivos y si las interacciones tuvieron lugar de hecho en células eucariotas. Esto será más relevante que el ensayo de extracción de proteínas (*pull down*)/inmunoprecipitación usado generalmente de forma complementaria a los datos de Y2H, ya que esta estrategia requiere la lisis celular.

40 También es posible el análisis de alto rendimiento de interactomas de proteínas en placas de 96 pocillos en células fijadas o vivas. Puede ser necesario un fondo de vidrio para la formación de imágenes de alta resolución con lentes sumergidas en aceite (véase, por ejemplo, Zell-Kontakt GmbH; referencia: 5241-20).

Según un primer objeto, la invención se refiere a un método para detectar una interacción entre uno o más cebos proteicos y una o más presas candidatas en una célula eucariota, que comprende las etapas de:

45 a) proporcionar una célula eucariota que expresa (i) uno o más cebos proteicos, y (ii) una o más presas candidatas, en el que dicho cebo proteico comprende un resto de cebo y un resto de unión a tubulina polimerizada,

50 b) determinar la aparición de una interacción entre dicho uno o más cebos proteicos y dicha una o más presas candidatas en la célula eucariota, en el que dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota. Dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha interacción.

Ventajosamente, la detección de la presa candidata en la célula eucariota es capaz de generar un "patrón similar a microtúbulos" o un "patrón similar a tubulina polimerizada" si (i) la presa candidata es capaz de interactuar con el cebo proteico, y si (ii) el cebo proteico se une simultáneamente a microtúbulos o a tubulina polimerizada,

respectivamente, en la célula eucariota.

De este modo, la detección de dicho “patrón similar a microtúbulos” o “patrón similar a tubulina polimerizada” es indicativa de una interacción entre dicho uno o más cebos proteicos y dicha una o más presas candidatas en la célula eucariota.

- 5 En particular, la detección de la presa candidata en la célula eucariota es capaz de generar un “patrón similar a microtúbulos” o “patrón similar a tubulina polimerizada” si (i) la presa candidata es capaz de interactuar con el resto de cebo, y si (ii) el resto de unión a tubulina polimerizada se une simultáneamente a microtúbulos o a tubulina polimerizada, respectivamente, en la célula eucariota.

- 10 De este modo, según dicha realización, la detección de dicho “patrón similar a microtúbulos” o “patrón similar a tubulina polimerizada” es también indicativa de una interacción entre dicho uno o más restos de cebo y dicha una o más presas candidatas en la célula eucariota.

De este modo, la invención también se refiere a un método para detectar una interacción entre uno o más restos de cebo y una o más presas candidatas en una célula eucariota, que comprende las etapas de:

- 15 a) proporcionar una célula eucariota que expresa (i) uno o más cebos proteicos, y (ii) una o más presas candidatas, en el que dicho cebo proteico comprende un resto de cebo y un resto de unión a tubulina polimerizada,
- 20 b) determinar la aparición de una interacción entre dicho uno o más restos de cebo y dicha una o más presas candidatas en la célula eucariota, en el que dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota. Dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha interacción.

La una o más presas candidatas pueden ser una proteína y/o un ácido nucleico.

- 25 Los métodos y usos de la invención son adecuados para detectar una interacción entre uno o más cebos proteicos y una o más presas candidatas, que incluyen un cebo proteico y una presa candidata, un cebo proteico y más de una presa candidata, y más de un cebo proteico y una presa candidata.

Los métodos de la invención también son adecuados para detectar una interacción entre una pluralidad de cebos proteicos y una pluralidad de presas candidatas.

Según otra realización, el método es para detectar una interacción entre un cebo proteico y una presa candidata en una célula eucariota.

- 30 Según la invención, una “célula eucariota” incluye cualquier célula eucariota que sea susceptible de contener y/o expresar tubulina polimerizada, tal como microtúbulos.

Según una realización particular, la célula eucariota se selecciona en un grupo que comprende células primarias, estirpes celulares estables, células madre, y células Madre Pluripotentes Inducidas (IPS). Por ejemplo, la célula eucariota se puede seleccionar de la lista que comprende o consiste en células de mamífero y células de insecto.

- 35 En particular, la célula eucariota se puede seleccionar de la lista que comprende o que consiste en: células HEK, células NRK y células HeLa, en particular células NRK.

La célula en la etapa b) puede ser una célula fijada o una célula viva.

Cuando la célula en la etapa b) es una célula viva, se prefiere que el cebo proteico y/o la presa candidata comprendan una etiqueta detectable, tal como una etiqueta de fluorescencia.

- 40 El uso de una célula viva en la etapa b) permite la detección de la presa candidata a lo largo de polímeros dinámicos de tubulina, tales como microtúbulos, cuando interactúa con el cebo.

Cuando la célula en la etapa b) es una célula fijada, el método requiere una etapa adicional de fijación, antes de la etapa b). Los protocolos para obtener células fijadas son bien conocidos en la técnica.

- 45 En cualquier caso, los microtúbulos aparecen como líneas brillantes en las imágenes de fluorescencia, que hacen a la unión de las presas en ellas fácilmente detectables al sondear, por ejemplo, la aparición de líneas brillantes largas de tamaño μm usando la señal de fluorescencia de la presa, lo que conduce a un “patrón similar a microtúbulos” caracterizante.

La presa candidata puede ser una presa candidata modificada o no modificada.

La presa candidata también puede ser una presa candidata homóloga o heteróloga.

El cebo proteico y/o la presa candidata también pueden comprender un resto detectable. En particular, el resto detectable puede ser una proteína fluorescente.

El resto detectable se puede seleccionar en un grupo que comprende: GFP, YFP, XFP, RFP, CFP, DsRED, mCherry, luciferasa, colorantes de cianina tales como Cy2 o Cy3 o Cy5, fluoresceína, rodamina, y colorantes Alexa fluor.

En particular, la proteína fluorescente se puede seleccionar en un grupo que comprende: GFP, YFP, XFP, RFP, CFP, DsRED, y mCherry.

Las proteínas fluorescentes son ampliamente conocidas en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, en Shaner y Steinbach y Tsien (*A guide to choosing fluorescent proteins*; Nat Methods; 2(12):905-9; 2005).

10 El método de la invención proporciona una respuesta rápida y eficaz con respecto a si el cebo y la presa interactúan o no dentro de un mismo complejo macromolecular en tiempo real, pero no dice necesariamente si la interacción es directa o no. Para superar esta limitación, se puede llevar a cabo simultáneamente FRET: el marcador fluorescente del cebo será el dador, mientras que el de la presa será el aceptor. También se puede usar Y2H para sondear la interacción directa en un experimento complementario.

15 Según una realización, el resto detectable es adecuado para transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).

Según una realización, la invención también se refiere a un método como se define anteriormente, que comprende la etapa de determinar la aparición de una interacción directa entre el cebo y la presa en una célula eucariota usando transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).

20 Según dicha realización, la invención también se refiere a un método para detectar una interacción entre uno o más cebos proteicos y una o más presas candidatas en una célula eucariota, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una célula eucariota que expresa (i) uno o más cebos proteicos, y (ii) una o más presas candidatas, en el que dicho cebo proteico comprende un resto de cebo y un resto de unión a tubulina polimerizada,

25 b) determinar la aparición de una interacción entre dicho uno o más cebos proteicos y dicha una o más presas candidatas en la célula eucariota, en el que dicho cebo proteico está unido a tubulina polimerizada en la célula eucariota, y

c) determinar la aparición de una interacción directa entre dicho cebo proteico y la presa candidata usando transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET),

30 en el que las etapas b) y c) de determinación de la aparición de una interacción se pueden lograr en ese orden o en un orden diferente. Dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha interacción.

35 Según otra realización, la invención se refiere a un método como se define anteriormente, en el que, en la etapa b), la determinación de la aparición de dicha presa en la célula eucariota es un método de detección seleccionado en un grupo que comprende: unión a un anticuerpo, hibridación con un ácido nucleico, y/o medida de la fluorescencia.

Por ejemplo, la etapa b) de determinación de la aparición de una interacción se puede lograr usando microscopía por vídeo.

40 La etapa b) de determinación de la aparición de una interacción también se puede lograr usando un método de reconocimiento asistido por ordenador, tal como un método de reconocimiento asistido por ordenador mostrado en Altinok et al. (*Activity analysis in microtubule videos by mixture of hidden Markov models*; Computer Vision and Pattern Recognition, IEEE Computer Society Conference, 2, 1662-1669; 2006).

45 Además, la invención se refiere a un método como se define anteriormente, que comprende, antes de la etapa b), al menos una etapa de despolimerización de la tubulina celular usando un fármaco despolimerizante de los microtúbulos, o exposición al frío.

Para ese fin, también se pueden usar fármacos que alteran los microtúbulos, fármacos despolimerizantes de los microtúbulos, o fármacos que desamblan los microtúbulos, tales como nocodazol, vinblastina, vincristina, colchicina, colcemida, podofilotoxina, rizoxina o vinorelbina.

50 La exposición al frío es conocida en la técnica, y generalmente se refiere a una etapa de despolimerización de los microtúbulos exponiéndolos a baja temperatura. Los protocolos que se refieren a la exposición al frío son conocidos en la técnica, y se enseñan, por ejemplo, en Ochoa et al. (*Cold exposure reveals two populations of microtubules in pulmonary endothelia*; Am. J. physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.; 300:L132-L138; 2011).

Las etapas de polimerización y despolimerización como se definen anteriormente se pueden repetir ventajosamente a lo largo del tiempo, conduciendo a una sucesión de fases alternantes de asociación y disociación del cebo a lo largo del tiempo.

5 De este modo, la invención también se refiere a un método para detectar una interacción entre uno o más cebos proteicos y una o más presas candidatas en una célula eucariota, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una célula eucariota que expresa (i) uno o más cebos proteicos, y (ii) una o más presas candidatas, en el que dicho cebo proteico comprende un resto de cebo y un resto de unión a tubulina polimerizada,

10 b) opcionalmente despolimerizar tubulina celular usando un fármaco despolimerizante de los microtúbulos, o exposición al frío,

c) opcionalmente determinar la aparición de una primera interacción entre dicho uno o más cebos proteicos y dicha una o más presas candidatas en la célula eucariota, en el que dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota,

15 d) opcionalmente despolimerizar tubulina celular usando un fármaco despolimerizante de los microtúbulos, o exposición al frío, y

e) determinar la aparición de una segunda interacción entre dicho uno o más cebos proteicos y dicha una o más presas candidatas en la célula eucariota, en el que dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota.

20 En la etapa c), dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha primera interacción.

En la etapa e), dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha segunda interacción.

25 Por supuesto, las etapas b) y d) de despolimerización se pueden repetir a lo largo del tiempo.

Según dichos métodos, es posible detectar no solo las interacciones entre los cebos y las presas en la célula eucariota, sino también la dinámica de la tubulina polimerizada.

30 Debido a que el cebo y la presa son capaces de interactuar en un entorno vivo, un objeto de la invención es también permitir no solo la detección de una interacción entre el cebo y la presa, sino también detectar modificaciones post-traduccionales que puedan ocurrir en la célula eucariota. De este modo, los métodos de la invención pueden incluir además una etapa de detectar la aparición de una modificación post-traduccional, por ejemplo del resto de cebo y/o de la presa candidata. Las modificaciones post-traduccionales son bien conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, modificaciones como sucesos de fosforilación.

35 De este modo, este método es también eficaz para identificar, en tiempo real, sucesos post-traduccionales, tal como la fosforilación, que modifican las interacciones de cebo-presa, usando, por ejemplo, microscopía por vídeo, como se detalla en los ejemplos para las interacciones de eIF2B-eIF2A.

40 La invención también se refiere al uso de un resto de unión a tubulina polimerizada, como herramienta para determinar la aparición de una interacción entre dicho uno o más cebos y una o más presas candidatas en una célula eucariota. Dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha interacción.

45 En particular, la invención se refiere al uso de un resto de unión a tubulina polimerizada fusionado a uno o más cebos, como herramienta para determinar la aparición de una interacción entre dicho uno o más cebos y una o más presas candidatas en una célula eucariota. Dicho cebo proteico se une a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha interacción.

50 Más particularmente, la invención se refiere al uso de al menos un Dominio de Unión a Microtúbulos fusionado a uno o más cebos, como herramienta para detectar la aparición de una interacción entre dicho uno o más cebos y una o más presas candidatas en una célula eucariota. Dicho cebo proteico se une a los microtúbulos en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dichos microtúbulos, detectando de ese modo dicha interacción.

Según dicha realización, la invención también se refiere al uso de una pluralidad de Dominios de Unión a Microtúbulos, tales como tándems de Dominios de Unión a Microtúbulos, fusionados a uno o más cebos, como

herramienta para determinar la aparición de una interacción entre dicho uno o más cebos y una o más presas candidatas en una célula eucariota.

Preferiblemente, el resto de unión a tubulina polimerizada y/o el Dominio de Unión a Microtúbulos se pueden usar en forma de un cebo proteico como se describe posteriormente aquí más abajo.

5 Cebo proteico

También se describe aquí un cebo proteico, que es adecuado para los métodos y usos como se definen anteriormente.

En particular, se describe aquí un cebo proteico que comprende (i) un resto de unión a tubulina polimerizada, que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD), y (ii) un resto de cebo.

10 Según algunas realizaciones, el “resto de cebo” no interacciona, o se localiza, con tubulina polimerizada o microtúbulos en la célula eucariota.

Según algunas realizaciones, el resto de cebo puede consistir en anticuerpos o fragmentos de los mismos, o proteínas de unión a ácidos nucleicos. De este modo, según algunas realizaciones, el cebo proteico comprende:

- un resto de unión a tubulina polimerizada, que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos, y
- 15 - un resto de cebo que no interacciona con tubulina polimerizada en la célula eucariota.

Según algunas realizaciones, el resto de cebo puede consistir en anticuerpos o fragmentos de los mismos, o proteínas de unión a ácidos nucleicos. De este modo, según algunas realizaciones, el cebo proteico comprende:

- un resto de unión a tubulina polimerizada, que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos, y
- 20 - un resto de cebo, que consiste en anticuerpos, o fragmentos de los mismos, o proteínas de unión a ácidos nucleicos.

Una barrera para la interacción puede ser una reducción de la accesibilidad del cebo cuando se fusiona a un resto de unión a tubulina polimerizada, debido a la proximidad de la superficie de los microtúbulos. Para maximizar la accesibilidad del cebo a la presa, el cebo se puede unir a un dominio de proyección, que es preferiblemente una cola no estructurada que permite una separación de longitud de nm entre el microtúbulo o la superficie de tubulina polimerizada y el cebo.

25 De este modo, según una realización particular, un cebo proteico adecuado para los métodos y usos de la invención comprende un resto de unión a tubulina polimerizada que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD), y un resto de cebo.

30 Ventajosamente, los Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD) se seleccionan entre un grupo que comprende: tau de secuencia SEQ ID N°1, MAP1A de secuencia SEQ ID N°2, MAP2 de secuencia SEQ ID N°3, MAP4 de secuencia SEQ ID N°4, MAP6 de secuencia SEQ ID N°5, EB-1 de secuencia SEQ ID N°6, o cualquier otro Dominio de Unión a Microtúbulos que derive de Proteínas Asociadas a los Microtúbulos, y combinaciones de los mismos.

Según algunas realizaciones, el cebo proteico comprende:

- un resto de unión a tubulina polimerizada, que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos, seleccionado en un grupo que consiste en: tau de secuencia SEQ ID N°1 y SEQ ID N°10 a 14, MAP1A de secuencia SEQ ID N°2, MAP2 de secuencia SEQ ID N°3, MAP4 de secuencia SEQ ID N°4, EB-1 de secuencia SEQ ID N°6, y/o fragmentos, y combinaciones de los mismos; y
- 35 - un resto de cebo.

Según algunas realizaciones, el cebo proteico comprende:

- un resto de unión a tubulina polimerizada, que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos, seleccionado en un grupo que consiste en: tau de secuencia SEQ ID N°1 y SEQ ID N°10 a 14, MAP1A de secuencia SEQ ID N°2, MAP2 de secuencia SEQ ID N°3, MAP4 de secuencia SEQ ID N°4, EB-1 de secuencia SEQ ID N°6, y/o fragmentos, y combinaciones de los mismos; y
- 40 - un resto de cebo que no interacciona con tubulina polimerizada en la célula eucariota.

45 Según algunas realizaciones, el cebo proteico comprende:

- un resto de unión a tubulina polimerizada, que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos, seleccionado en un grupo que consiste en: tau de secuencia SEQ ID N°1 y SEQ ID N°10 a 14, MAP1A de secuencia SEQ ID N°2, MAP2 de secuencia SEQ ID N°3, MAP4 de secuencia SEQ ID N°4, EB-1 de

secuencia SEQ ID N°6, y/o fragmentos, y combinaciones de los mismos; y

- un resto de cebo que consiste en anticuerpos, o fragmentos de los mismos, o proteínas de unión a ácidos nucleicos.

5 En consecuencia, el cebo proteico puede comprender además una región Enlazadora (L) situada entre el resto de unión a tubulina polimerizada y el resto de cebo.

Una región Enlazadora (L) es generalmente un dominio no estructurado, en particular un dominio no estructurado que permite una separación de longitud de nm entre la superficie de tubulina polimerizada y el cebo, que es crítico para incrementar la accesibilidad del cebo a la presa. Los ejemplos de regiones Enlazadoras son conocidos en la técnica.

10 Los dominios de proyección se encuentran en Proteínas Asociadas a los Microtúbulos (MAPs), tales como MAP2 o tau, y están implicados en la formación de haces de microtúbulos, y en la determinación de la separación entre los microtúbulos. También pueden interactuar con otras estructuras citoesqueléticas.

Preferiblemente, a fin de maximizar la accesibilidad del cebo a la presa, el cebo se une a una región Enlazadora, que es un dominio de proyección de un MAP, tal como tau, o un fragmento del mismo.

15 De este modo, según una realización preferida, el cebo proteico comprende (i) un resto de unión a tubulina polimerizada, que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD), (ii) un dominio de proyección, y (iii) un resto de cebo.

Un “dominio de proyección” adecuado para los métodos y usos de la invención puede comprender o consistir en un fragmento N-terminal de tau.

20 Según una realización particular, un “dominio de proyección” es el dominio de proyección de tau de secuencia SEQ ID N°9, o un fragmento del mismo.

25 La región Enlazadora, o dominio de proyección, puede ser de longitud variable, que incluye cualquier región o dominio como se define anteriormente de 1 a 150 aminoácidos de longitud, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 y 150 aminoácidos de longitud.

30 Cuando el cebo proteico comprende (i) un resto de unión a tubulina polimerizada, que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos, y (ii) un dominio de proyección, es preferible que ambas partes sean parte de la misma proteína, en particular de la misma Proteína Asociada a los Microtúbulos, tal como tau.

El resto de cebo puede comprender o no un resto detectable, tal como una proteína fluorescente.

35 Ventajosamente, el cebo proteico puede comprender además cualquier resto detectable como se define anteriormente, en su parte N-terminal o C-terminal, tal como un marcador fluorescente que es detectable usando microscopía de fluorescencia.

De manera no limitativa, el resto detectable puede ser una proteína fluorescente, tal como una proteína seleccionada en un grupo que comprende: GFP, YFP, XFP, RFP, CFP, DsRED, y mCherry.

Vectores y estirpes celulares

40 También se describe aquí un vector que contiene un casete de expresión adecuado para expresar un cebo proteico según los usos y métodos de la invención.

De este modo, un vector adecuado para los usos y métodos de la invención es adecuado para expresar un cebo proteico, que incluye vectores que comprenden:

- 45 - un casete de expresión que codifica un resto de cebo fusionado a un resto de unión a tubulina polimerizada que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD), o, como alternativa,
- un casete de expresión que codifica un resto de unión a tubulina polimerizada que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD) y que es directamente adecuado para clonar al menos un resto de cebo como un cebo de proteína fusionada.

50 Un casete de expresión es directamente adecuado para clonar al menos un resto de cebo como un cebo de proteína de fusión, según protocolos de clonación estándar, si es adecuado para la introducción de un inserto que codifica

dicho resto de cebo en el marco con dicho resto de unión a tubulina polimerizada. Los protocolos de clonación estándar incluyen protocolos que comprenden una etapa de digestión con enzimas de restricción, y/o recombinación específica del sitio.

5 Un vector puede incluir un, o más de un, marcador seleccionable. Un marcador seleccionable es un gen marcador introducido en una célula, especialmente una bacteria o células en cultivo, que confiere un rasgo adecuado para la selección artificial.

Según realizaciones preferidas, el casete de expresión codifica un resto de unión a tubulina polimerizada que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD) que derivan de una Proteína Asociada a los Microtúbulos de la invención.

10 Según una realización muy preferida, el casete de expresión codifica un resto de unión a tubulina que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD) que derivan de la proteína tau de secuencia SEQ ID N°10.

Los vectores adecuados para los usos y métodos de la invención pueden comprender:

15 - un casete de expresión que codifica una biblioteca de proteínas para dicho resto de cebo fusionado a un resto de unión a tubulina polimerizada que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD), o, como alternativa,

- un casete de expresión que codifica un resto de unión a tubulina polimerizada que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD) y que es directamente adecuado para clonar un ácido nucleico que codifica una biblioteca de proteínas para dicho resto de cebo como un cebo de proteína de fusión.

20 Los ejemplos de vectores que son adecuados para la expresión en células eucariotas incluyen el plásmido Gateway® pEF-Dest51.

También se describen aquí estirpes celulares que se transfectan con un vector como se describió previamente, y/o que expresan de forma estable un cebo proteico adecuado para los métodos y usos de la invención.

Se describen además aquí kits para detectar una interacción de uno o más cebos proteicos con una o más presas candidatas en una célula, que comprenden un cebo proteico, un vector, y/o una estirpe celular de la invención.

25 También se describe aquí un kit para detectar una interacción de uno o más cebos proteicos con una o más presas candidatas en una célula, que comprende un cebo proteico, un vector, y/o una estirpe celular adecuada para los métodos y usos de la invención, y combinaciones de los mismos.

30 También se describe aquí un kit como se define anteriormente, que comprende una biblioteca de ácidos nucleicos que codifica el mencionado cebo o la mencionada presa, y/o una biblioteca de proteínas que comprende dicho cebo o la mencionada presa, y/o un reactivo adecuado para detectar la aparición de dicho cebo o dicha presa en la mencionada célula, y combinaciones de los mismos.

También se describe aquí un kit para detectar una interacción de uno o más cebos proteicos con una o más presas candidatas en una célula eucariota, que comprende:

35 - un vector de la invención, y/o una estirpe celular de la invención,
- opcionalmente, una biblioteca de proteínas para uno o más restos de cebo,
- opcionalmente, un reactivo adecuado para detectar la aparición de dicho cebo proteico y/o dicha presa candidata en una célula eucariota.

También se describe aquí un kit para detectar una interacción de uno o más cebos proteicos con una o más presas candidatas en una célula eucariota, que comprende:

40 - un vector de la invención, y/o una estirpe celular de la invención,
- una biblioteca de ácidos nucleicos o una biblioteca de proteínas que codifica uno o más restos de cebo,
- opcionalmente, un reactivo adecuado para detectar la aparición de dicho cebo proteico y/o dicha presa candidata en una célula eucariota.

EJEMPLOS

45 A. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Construcción del plásmido del cebo fusionado a tau.

Se fusiona una proteína de interés a un dominio de unión a microtúbulos y a un dominio de proyección no

estructurado. Se usa la isoforma más larga de la proteína tau humana (número de acceso: NP_005901.2), de secuencia SEQ ID N°10, debido a la presencia de una región no estructurada (o dominio de proyección) en su parte N-terminal para favorecer la accesibilidad del cebo a la presa, y debido a la repetición de los dominios de unión a microtúbulos de tau en su parte C-terminal. La secuencia SEQ ID N°10 incluye cuatro dominios de unión a microtúbulos (acceso NP_005901.2: aa: 243-274; 275-305, 306-336 y 337-368, respectivamente de secuencias SEQ ID N°11-14.

El gen tau, que contiene en el extremo 5' los siguientes sitios de restricción: Pacl, Ascl y SphI, se amplificó mediante PCR y se insertó en el plásmido de entrada Gateway pCR8/GW/TOPO (Invitrogen™). El plásmido resultante se mencionará aquí en lo sucesivo como el "plásmido de entrada de cadena principal". Los genes de YB-1 y eIF2B se amplificaron mediante PCR usando cebadores que contienen los sitios de restricción Pacl y Ascl, y después se insertaron en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen™).

Los genes de GFP y RFP se amplificaron mediante PCR usando cebadores que contienen los sitios de restricción Ascl y SphI, y después se insertaron en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen™) usando protocolos estándar. Los plásmidos que contienen todos los genes mencionados anteriormente se propagaron y purificaron mediante Mini Kit (Thermo Scientific, referencia K0503), y los genes insertados se verificaron mediante secuenciación. Los genes de YB-1 y eIF2B, insertados en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO, se digirieron con Pacl y Ascl. Los genes de GFP y RFP, insertados en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO, se digirieron con Ascl y SphI.

Se llevó a cabo la ligación a fin de insertar los genes mencionados anteriormente en el plásmido de entrada de cadena principal, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (Pacl, Ascl y SphI).

Se generaron los siguientes plásmidos de entrada:

- GFP-tau-pCR8/GW/TOPO
- YB-1-tau-pCR8/GW/TOPO
- YB-1-GFP-tau-pCR8/GW/TOPO
- YB-1-RFP-tau-pCR8/GW/TOPO
- eIF2B-tau-pCR8/GW/TOPO
- eIF2B-RFP-tau-pCR8/GW/TOPO

Las reacciones de recombinación LR (Invitrogen™) también se llevaron a cabo según el protocolo del fabricante a fin de transferir los genes de interés desde los plásmidos de entrada de cadena principal en el plásmido Gateway® pEF-Dest51 adecuado para la expresión proteica en células eucariotas.

De este modo, también se generaron los siguientes plásmidos de expresión:

- GFP-tau-pEF-Dest51
- YB-1-tau-pEF-Dest51
- YB-1-GFP-tau-pEF-Dest51
- YB-1-RFP-tau-pEF-Dest51
- eIF2B-tau-pEF-Dest51
- eIF2B-RFP-tau-pEF-Dest51

El fragmento de eIF2a-GFP se amplificó mediante PCR, y se insertó en el plásmido pcDNA3.3 TOPO TA (Invitrogen™).

2. Preparación de células fijadas.

Células que crecen en cubreobjetos se lavaron con PBS y se fijaron con metanol frío durante 15 min. a -20°C. Tras la fijación, las células se lavaron en PBS y se incubaron durante 1 hora en disolución de bloqueo. Las células se incubaron entonces durante 1 hora con anticuerpos primarios, se lavaron a conciencia en PBS, y se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados con fluorocromos en disolución de bloqueo. Tras los lavados finales con PBS, las muestras se prepararon para análisis de microscopía de fluorescencia. La fijación con metanol se prefirió debido a que revela mejor las estructuras de los microtúbulos.

3. Microscopía por vídeo de células vivas.

Las células se transfectaron transitoriamente con los vectores de expresión indicados, y después se cultivaron

durante 24 h antes de la monitorización en tiempo real de los microtúbulos. La videomicroscopía de fluorescencia se implementó en un microscopio invertido Axiovert 220; Carl Zeiss MicroImaging, Inc). La emisión de GFP se detectó con un objetivo 63x/1.4 NA. Las imágenes de transcurso de tiempo se capturaron a intervalos de 4 s usando una cámara de CCD enfriada (Zeiss).

5 Las células que se hacen crecer en placas de múltiples pocillos de fondo de vidrio (Zell-Kontakt GmbH) se pueden analizar automáticamente para aplicaciones de alto rendimiento usando un analizador de células de contenido elevado (ejemplo: BD Pathway TM855, usado preferiblemente con lentes sumergidas en aceite, para obtener una mayor resolución). La detección con una salida booleana (interacción o no interacción) puede ser seguida usando un método de reconocimiento asistido por ordenador.

10 B. RESULTADOS

EJEMPLO 1. Protocolo general para el análisis de alto rendimiento y sistema de detección.

15 1) Las secuencias de ADNc que codifican una proteína conocida o una cadena polipeptídica denominada "cebo" se insertan en un plásmido que dirige, dentro de la célula, la síntesis de este cebo fusionado a una proteína de unión a los microtúbulos (tau, MAP2) o dominio enlazado a un dominio de proyección para favorecer la accesibilidad del cebo a la presa. El cebo se puede fusionar adicionalmente a un marcador fluorescente, como una proteína fluorescente (GFP, RFP, ...).

20 2) Las secuencias de ADNc que codifican la "presa", un polipéptido o proteína, se insertan en un plásmido para dirigir su expresión dentro de la célula. Esta presa está fusionada posiblemente a un marcador fluorescente, tal como una proteína fluorescente (es decir, GFP o XFP), para su detección en células vivas vía microscopía de fluorescencia.

3) Una matriz de muestras celulares en placas de 6 a 96 pocillos se cotransfecta con diferentes presas (véase la figura 1) para identificar diversas parejas de interacción para un cebo dado en un rendimiento elevado. Un sistema de detección automático permite el reconocimiento de las presas unidas a los microtúbulos, a fin de obtener un resultado booleano (que interactúan o que no interactúan).

25 4) Detección:

30 i) Para la detección en células vivas o fijadas (figuras 2 y 3), la coexpresión del cebo y presa fluorescentes permite la detección mediante videomicroscopía fluorescente de la presa a lo largo de los microtúbulos dinámicos, cuando interacciona con el cebo. La formación de imágenes de transcurso del tiempo durante menos de 1 minuto (15 imágenes por minuto) es suficiente para detectar las estructuras de microtúbulos con una sensibilidad elevada. La sensibilidad en células vivas está mejorada en comparación con las células fijadas, puesto que los microtúbulos muy dinámicos pueden permitir la detección de presas unidas a los cebos vía imágenes de fluorescencia diferenciales de la presa (imagen en el tiempo t_0 menos imágenes en el tiempo $t_0+\Delta t$, Desforges et al.; An intercellular polyamine transfer via gap junctions regulates proliferation and response to stress in epithelial cells. Mol Biol Cell 24, 1529-1543; 2013), una técnica clásica para resaltar los movimientos de los microtúbulos que es útil aquí para restar la fluorescencia de fondo de las presas que no interactúan.

40 Para mejorar aún más la accesibilidad del cebo a la presa, y la sensibilidad de detección, se pueden despolimerizar los microtúbulos en células vivas, usando fármacos reversibles, como nocodazol, que permiten que el cebo explore libremente el citoplasma e interaccione con el cebo lejos de la superficie de los microtúbulos. Después, una vez que se elimina por lavado el fármaco despolimerizante de los microtúbulos, los microtúbulos vuelven a crecer rápidamente a partir del centrosoma (<2 min.), capturándose tal patrón mediante videomicroscopía usando la fluorescencia de la presa siempre que tenga lugar una interacción entre el cebo y la presa. Para potenciar la sensibilidad, reduciendo la relación de señal de fluorescencia a ruido, se puede usar la microscopía de fluorescencia confocal o la microscopía de fluorescencia interna total (TIRF).

50 ii) Para la detección en células fijadas (figura 3), el método permite la detección mediante fluorescencia de presas nativas (proteínas endógenas, ARN endógeno, u otras biomoléculas) llevadas a los microtúbulos gracias a su interacción con el cebo. La detección se puede realizar usando microscopía de fluorescencia óptica clásica tras marcar la presa con anticuerpos específicos (proteínas escogidas por interaccionar potencialmente con el cebo y por su uso como controles negativos), o tras la hibridación *in situ* cuando el objetivo es detectar la interacción de ácidos nucleicos con el cebo (ARN en particular, incluyendo miARN y ARNm). Esta opción es también relevante cuando el marcador fluorescente de la presa (GFP, RFP, u otros marcadores) pueden impedir las interacciones presa-cebo, o cuando la sobreexpresión de la presa puede sesgar los resultados.

55 Para la detección en células fijadas que coexpresan el cebo y presas fluorescentes, la detección fluorescente de las presas llevadas a los microtúbulos debido a su interacción con el cebo se puede llevar a cabo directamente usando un microscopio óptico clásico, debido a su marcador fluorescente.

En cualquier caso, los microtúbulos aparecen como líneas brillantes en las imágenes de fluorescencia, lo que hace a la unión de las presas en ellos fácilmente detectable al sondar la aparición de líneas brillantes de longitud de μm usando la señal en fluorescencia de la presa.

5 iii) También se pueden usar estirpes celulares estables, que expresan el cebo, para mejorar la eficiencia de la coexpresión y facilitar las investigaciones de la interacción de un cebo proteico dado. Si la expresión del cebo es tóxica, se puede proponer un sistema de expresión inducible en una estirpe celular transfectada de forma estable, para obtener en un tiempo dado una expresión significativa.

10 iv) Se puede implementar un marcaje de FRET dual (marcador de CFP para el cebo y marcador de YFP para la presa, por ejemplo), para detectar simultáneamente si el cebo y la diana, que interactúan en los mismos complejos macromoleculares (presa llevada a los microtúbulos), están unidos directamente entre sí en este complejo (señal de FRET).

EJEMPLO 2. Detección de autoatracción de YB-1 y de la unión de YB-1 a sondas de poli-T marcadas con cy3 en células NRK fijadas y vivas.

15 Se sabe que YB-1 (número de acceso: NP_004550.2) es una de las proteínas de unión al ARNm del núcleo (Nekrasov et al., The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. J Biol Chem 278, 13936-13943; 2003). Investigamos entonces si las moléculas de ARNm pueden ser llevadas o no a los microtúbulos usando como cebo YB-1-tau (Figura 1C).

20 En la Figura 1C mostramos células NRK transfectadas con la proteína YB-1 humana, una proteína de unión a ARNm, fusionada a tau y a GFP. El cebo, YB-1-GFP-tau, se detectó entonces de hecho en los microtúbulos en la imagen de fluorescencia de GFP, en contraste con YB-1-GFP o con YB-1 endógena, que permanecieron dispersas en el citoplasma.

25 Las moléculas de ARNm se detectaron claramente en los microtúbulos usando hibridación *in situ* (sondas de poli-T marcadas con cy3) en células transfectadas y fijadas, pero no en aquellas que no expresaron YB-1-tau. Este resultado valida el hecho de que YB-1, fusionada a tau y llevada a los microtúbulos, es capaz de interactuar con ARNm.

30 Otra propiedad de YB-1 es que interactúa con sí misma, como se muestra vía el cribado de dos híbridos (Ashizuka et al.; Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. Mol Cell Biol 22, 6375-6383; 2002). Sondamos tal interacción en células fijadas usando YB-1-GFP como presa, e YB-1-tau como cebo.

 En la Figura 4B, células NRK se transfectaron con el plásmido YB-1-tau sin el marcador de GFP. El cebo, YB-1-tau, se lleva a los microtúbulos, como se observa claramente usando el marcaje con anti-YB-1 (Figura 4B, en este caso se detectan entonces tanto YB-1 endógena como YB-1 fusionada a tau).

35 De este modo, encontramos que GFP-YB-1 es atraída en los microtúbulos en presencia de YB-1-tau (Figura 4). Como control negativo, observamos si otra proteína de unión a ARNm, TIA-1, que no se ha dado a conocer que interactúe con YB-1, podría colocalizarse con los microtúbulos, usando nuestro método. Los resultados muestran que TIA-1 no se colocaliza con los microtúbulos usando YB-1-tau como cebo, de este modo de acuerdo con la falta de interacción esperada entre las dos proteínas, al menos en la presente condición (Figura 5).

40 Células NRK también se cotransfectaron con YB-1-tau (cebo) y con YB-1-GFP (presa). La videomicroscopía de células vivas reveló la aparición de estructuras microtubulares dinámicas (Figura 7), que no están presentes en células transfectadas solamente con YB-1-GFP. Este experimento permite así detectar la interacción de proteínas en tiempo real, y usar la dinámica de microtúbulos como herramienta para mejorar la sensibilidad de la detección.

EJEMPLO 3. Detección de la unión de eIF2A a eIF2B tras la fosforilación de eIF2A en células vivas.

45 En la Figura 6A, en células HeLa transfectadas con eIF2B-tau, eIF2B-tau se une a los microtúbulos, como se observa claramente usando el marcaje con anti-eIF2B.

50 Una de las respuestas tempranas en células de mamífero expuestas a estrés medioambiental (hipertermia, estrés osmótico, hipoxia, estrés oxidativo, virus) es bloquear el inicio de la traducción. Tal bloqueo del inicio está mediado por la fosforilación del factor de iniciación eIF2A vía diversas cinasas, como PKR y PERK. Esta fosforilación se produce en serina 51, y conduce a la unión fuerte de eIF2A a eIF2B. La formación de este complejo evita la regeneración de eIF2A-GDP (regeneración de GDP/GTP) mediante eIF2B (Krishnamoorthy et al.; Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. Mol Cell Biol 21, 5018-5030; 2001).

El hecho es que eIF2A está en gran exceso en comparación con eIF2B, de manera que, incluso si se fosforila una

pequeña fracción de eIF2A, entonces no hay disponible eIF2B libre para reciclar eIF2a, debido a la unión de eIF2A fosforilada a eIF2B.

5 Aprovechamos esta señal de estrés crítica para detectar la unión de eIF2A a eIF2B tras el estrés usando células HeLa humanas vivas cotransfectadas con tau-eIF2B (la subunidad ϵ humana) y eIF2A-GFP. En ausencia de estrés, la interacción de eIF2A-GFP con el cebo no es evidente, puesto que eIF2A está distribuida homogéneamente en el citoplasma (Figura 6A). Por el contrario, tras el tratamiento con arsenito (usado para inducir la fosforilación de eIF2A-GFP), eIF2A-GFP se detecta claramente en los microtúbulos, lo que demuestra que el cebo interacciona con la presa (Figura 6B, eIF2B-tau). Como control, la fosforilación de eIF2A al tratarla con arsenito se muestra mediante transferencia western.

10 También detectamos en la célula viva la interacción de eIF2A con eIF2B tras el tratamiento con arsenito para desencadenar la fosforilación de eIF2A, y de este modo su unión a eIF2B. Para este fin, células HeLa se cotransfectaron con eIF2B-tau (cebo) y eIF2A-GFP (presa), y se expusieron a 0,5 mM de arsenito durante 30 min. (Figura 8).

EJEMPLO 4. Análisis de imágenes y estadística.

15 Las células se cotransfectaron y analizaron después de 36 h cuando expresan tanto el cebo como la presa etiquetada con dos marcadores fluorescentes diferentes, RFP y GFP, respectivamente. Para la estadística, solamente se seleccionaron células con un aspecto sano.

20 Se prestó atención a la obtención de condiciones óptimas de resolución, y en cuáles de las células seleccionadas se distinguían claramente los microtúbulos usando como señal la fluorescencia del cebo. para la misma serie de experimentos, usamos las mismas lentes de objetivo (100x/1.4 NA o 65x/1.4 NA para células fijadas y vivas, respectivamente). En esta etapa, analizamos si, aunque usando lentes acromáticas, las imágenes rojas y verdes no se desplazaban unas con respecto a las otras. Tal desplazamiento, si lo hay, se puede corregir usando el complemento de ImageJ, "Align RGB planes".

25 Para cuantificar el nivel de colocalización entre un cebo proteico fusionado a tau y las presas de proteínas putativas, adaptamos un método previamente descrito en French et al. (Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. Nature protocols, 3, 619-628; 2008). Ambas imágenes se filtraron entonces usando un filtro de paso de altos de FFT para eliminar las frecuencias espaciales que no eran relevantes para las estructuras de los microtúbulos (estructuras más grandes que 5 μ m). Las imágenes del cebo y de la presa se fusionaron entonces en una única imagen verde-roja. Entonces, se usó el complemento de ImageJ, "PSC Co-localization", para medir el coeficiente de Spearman en tres regiones de interés diferentes (ROI) para la misma célula en la que se observan claramente los microtúbulos en la imagen del cebo. El área de la ROI se fijó (225 μ m²) para evitar cualquier sesgo debido a la superficie considerada para medir el coeficiente de correlación. Se controló que todos los resultados experimentales presentados en este artículo fuesen reproducibles al llevar a cabo cada experimento por triplicado. Para extrapolar el valor del coeficiente de Spearman al nivel de expresión cero del cebo proteico, usamos el método de mínimos cuadrados y un ajuste de curva lineal.

35 El coeficiente de Spearman es una elección mejor que el coeficiente de Pearson estrechamente relacionado, debido a que incluye una relación no lineal. De hecho, la intensidad de la fluorescencia puede no aumentar linealmente con el número de cebos proteicos o presas, especialmente cuando tienen lugar interacciones no radiactivas de corto alcance en los microtúbulos a densidades de superficie de cebo o de presa elevadas.

40 **EJEMPLO 5. Ensayo de recrecimiento de los microtúbulos**

Las células se colocaron en hielo durante 30 min. para disociar totalmente los microtúbulos en dímeros de tubulina, y se calentaron a 37°C en presencia de nocodazol 300 nM. El nocodazol se eliminó entonces por lavado del medio de cultivo. Tras la eliminación del nocodazol, comenzó el alargamiento de los microtúbulos de novo a partir del área centrosómica.

45 **EJEMPLO 6. Cuantificación de la colocalización entre el cebo y la presa en los microtúbulos.**

Las imágenes de la fluorescencia del cebo y de la presa, aquí YBRFP-Tau y YB-1-GFP, obtenidas de células fijadas, se filtraron en primer lugar de forma espacial usando la Transformada Rápida de Fourier. Se descartaron las frecuencias espaciales bajas, que corresponden a una característica mayor que 2 μ m. Las estructuras de los microtúbulos aparecieron entonces claramente en las imágenes del cebo proteico y, siempre que se produzca la colocalización, en las imágenes de la proteína de la presa. Las imágenes del cebo y de la presa se fusionaron, y se continuó usando el complemento "Pearson-Spearman Correlation Co-localization" para ImageJ.

55 El coeficiente de correlación medido es muy sensible al alineamiento de las imágenes de fluorescencia del cebo y de la presa. Cuando las imágenes están desplazadas, se puede usar el complemento de ImageJ, "Align RGB planes", para corregir el desplazamiento, lo que da como resultado un incremento del coeficiente de Spearman representativo de la colocalización entre YB-1-GFP y YB-1-RFP-Tau.

ES 2 739 525 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM UNIVERSITE D'EVRY - VAL D'ESSONNE

<120> MÉTODOS Y HERRAMIENTAS PARA DETECTAR INTERACCIONES EN CÉLULAS EUCARIOTAS USANDO ESTRUCTURAS Y DINÁMICA DE MICROTÚBULOS

5 <130> 70361

<150> EP14306190

<151> 2014-07-23

<160> 14

<170> BiSSAP 1.3

10 <210> 1

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala
1          5          10          15
Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro
20          25          30
Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser
35          40          45
Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser
50          55          60
Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg
65          70          75          80
Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala
85          90          95
Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser
100         105         110
Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile
115        120        125
Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys
130        135        140
Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
145        150        155        160
Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly
165        170        175
Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu
180        185        190
Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp
195        200        205
Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His
210        215        220
Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala
225        230        235        240
Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
245        250

```

15

<210> 2

<211> 358

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 2

Gln Asn Lys Ile Leu Glu Gly Leu Glu Lys Leu Arg His Leu Asp Phe

ES 2 739 525 T3

```

1           5           10           15
Leu Arg Tyr Pro Val Ala Thr Gln Lys Asp Leu Ala Ser Gly Ala Val
                20           25           30
Pro Thr Asn Leu Lys Pro Ser Lys Ile Lys Gln Arg Ala Asp Ser Lys
                35           40           45
Glu Ser Leu Lys Ala Thr Thr Lys Thr Ala Val Ser Lys Leu Ala Lys
                50           55           60
Arg Glu Glu Val Val Glu Glu Gly Ala Lys Glu Ala Arg Ser Glu Leu
65           70           75           80
Ala Lys Glu Leu Ala Lys Thr Glu Lys Lys Ala Lys Glu Ser Ser Glu
                85           90           95
Lys Pro Pro Glu Lys Pro Ala Lys Pro Glu Arg Val Lys Thr Glu Ser
                100           105           110
Ser Glu Ala Leu Lys Ala Glu Lys Arg Lys Leu Ile Lys Asp Lys Val
                115           120           125
Gly Lys Lys His Leu Lys Glu Lys Ile Ser Lys Leu Glu Glu Lys Lys
130           135           140
Asp Lys Glu Lys Lys Glu Ile Lys Lys Glu Arg Lys Glu Leu Lys Lys
145           150           155           160
Asp Glu Gly Arg Lys Lys Glu Glu Lys Lys Asp Ala Lys Lys Glu Glu Lys
                165           170           175
Arg Lys Asp Thr Lys Pro Glu Leu Lys Lys Ile Ser Lys Pro Asp Leu
180           185           190
Lys Pro Phe Thr Pro Glu Val Arg Lys Thr Leu Tyr Lys Ala Lys Val
195           200           205
Pro Gly Arg Val Lys Ile Asp Arg Ser Arg Ala Ile Arg Gly Glu Lys
210           215           220
Glu Leu Ser Ser Glu Pro Gln Thr Pro Pro Ala Gln Lys Gly Thr Val
225           230           235           240
Pro Leu Pro Thr Ile Ser Gly His Arg Glu Leu Val Leu Ser Ser Pro
                245           250           255
Glu Asp Leu Thr Gln Asp Phe Glu Glu Met Lys Arg Glu Glu Arg Ala
260           265           270
Leu Leu Ala Glu Gln Arg Asp Thr Gly Leu Gly Asp Lys Pro Phe Pro
275           280           285
Leu Asp Thr Ala Glu Glu Gly Pro Pro Ser Thr Ala Ile Gln Gly Thr
290           295           300
Pro Pro Ser Val Pro Gly Leu Gly Gln Glu Glu His Val Met Lys Glu
305           310           315           320
Lys Glu Leu Val Pro Glu Val Pro Glu Glu Gln Gly Ser Lys Asp Arg
                325           330           335
Gly Leu Asp Ser Gly Ala Glu Thr Glu Glu Glu Lys Asp Thr Trp Glu
340           345           350
Glu Lys Lys Gln Arg Glu
                355

```

<210> 3

<211> 308

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 739 525 T3

Phe Lys Gln Ala Lys Asp Lys Val Ser Asp Gly Val Thr Lys Ser Pro
 1 5 10 15
 Glu Lys Arg Ser Ser Leu Pro Arg Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Arg
 20 25 30
 Arg Gly Val Ser Gly Asp Arg Asp Glu Asn Ser Phe Ser Leu Asn Ser
 35 40 45
 Ser Ile Ser Ser Ser Ala Arg Arg Thr Thr Arg Ser Glu Pro Ile Arg
 50 55 60
 Arg Ala Gly Lys Ser Gly Thr Ser Thr Pro Thr Thr Pro Gly Ser Thr
 65 70 75 80
 Ala Ile Thr Pro Gly Thr Pro Pro Ser Tyr Ser Ser Arg Thr Pro Gly
 85 90 95
 Thr Pro Gly Thr Pro Ser Tyr Pro Arg Thr Pro His Thr Pro Gly Thr
 100 105 110
 Pro Lys Ser Ala Ile Leu Val Pro Ser Glu Lys Lys Val Ala Ile Ile
 115 120 125
 Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ala Thr Pro Lys Gln Leu Arg Leu Ile
 130 135 140
 Asn Gln Pro Leu Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser
 145 150 155 160
 Thr Asp Asn Ile Lys Tyr Gln Pro Lys Gly Gly Gln Val Gln Ile Val
 165 170 175
 Thr Lys Lys Ile Asp Leu Ser His Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 180 185 190
 Lys Asn Ile Arg His Arg Pro Gly Gly Gly Arg Val Lys Ile Glu Ser
 195 200 205
 Val Lys Leu Asp Phe Lys Glu Lys Ala Gln Ala Lys Val Gly Ser Leu
 210 215 220
 Asp Asn Ala His His Val Pro Gly Gly Gly Asn Val Lys Ile Asp Ser
 225 230 235 240
 Gln Lys Leu Asn Phe Arg Glu His Ala Lys Ala Arg Val Asp His Gly
 245 250 255
 Ala Glu Ile Ile Thr Gln Ser Pro Gly Arg Ser Ser Val Ala Ser Pro
 260 265 270
 Arg Arg Leu Ser Asn Val Ser Ser Ser Gly Ser Ile Asn Leu Leu Glu
 275 280 285
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Glu Asp Val Thr Ala Ala Leu Ala
 290 295 300
 Lys Gln Gly Leu
 305

<210> 4

5 <211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 739 525 T3

Leu Ala Thr Asn Thr Ser Ala Pro Asp Leu Lys Asn Val Arg Ser Lys
 1 5 10 15
 Val Gly Ser Thr Glu Asn Ile Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Arg Ala
 20 25 30
 Lys Val Glu Lys Lys Thr Glu Ala Ala Thr Thr Arg Lys Pro Glu
 35 40 45
 Ser Asn Ala Val Thr Lys Thr Ala Gly Pro Ile Ala Ser Ala Gln Lys
 50 55 60
 Gln Pro Ala Gly Lys Val Gln Ile Val Ser Lys Lys Val Ser Tyr Ser
 65 70 75 80
 His Ile Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
 85 90 95
 Gly Gly Gly Asn Val Gln Ile Gln Asn Lys Lys Val Asp Ile Ser Lys
 100 105 110
 Val Ser Ser Lys Cys Gly Ser Lys Ala Asn Ile Lys His Lys Pro Gly
 115 120 125
 Gly Gly Asp Val Lys Ile Glu Ser Gln Lys Leu Asn Phe Lys Glu Lys
 130 135 140
 Ala Gln Ala Lys Val Gly Ser Leu Asp Asn Val Gly His Leu Pro Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly

<210> 5

<211> 203

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Val Met Arg Gln Asp Tyr Arg Ala Trp Lys Val Gln Arg Pro Glu
 1 5 10 15
 Pro Ser Cys Arg Pro Arg Ser Glu Tyr Gln Pro Ser Asp Ala Pro Phe
 20 25 30
 Glu Arg Glu Thr Gln Tyr Gln Lys Asp Phe Arg Ala Trp Pro Leu Pro
 35 40 45
 Arg Arg Gly Asp His Pro Trp Ile Pro Lys Pro Val Gln Ile Ser Ala
 50 55 60
 Ala Ser Gln Ala Ser Ala Pro Ile Leu Gly Ala Pro Lys Arg Arg Pro
 65 70 75 80
 Gln Ser Gln Glu Arg Trp Pro Val Gln Ala Ala Ala Glu Ala Arg Glu
 85 90 95
 Gln Glu Ala Ala Pro Gly Gly Ala Gly Gly Leu Ala Ala Gly Lys Ala
 100 105 110
 Ser Gly Ala Asp Glu Arg Asp Thr Arg Arg Lys Ala Gly Pro Ala Trp
 115 120 125
 Ile Val Arg Arg Ala Glu Gly Leu Gly His Glu Gln Thr Pro Leu Pro
 130 135 140
 Ala Ala Gln Ala Gln Val Gln Ala Thr Gly Pro Glu Ala Gly Arg Gly
 145 150 155 160
 Arg Ala Ala Ala Asp Ala Leu Asn Arg Gln Ile Arg Glu Glu Val Ala
 165 170 175
 Ser Ala Val Ser Ser Ser Tyr Arg Asn Glu Phe Arg Ala Trp Thr Asp
 180 185 190
 Ile Lys Pro Val Lys Pro Ile Lys Ala Lys Pro
 195 200

<210> 6

<211> 145

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 739 525 T3

```

Tyr Asp Pro Val Ala Ala Arg Gln Gly Gln Glu Thr Ala Val Ala Pro
1      5      10      15
Ser Leu Val Ala Pro Ala Leu Asn Lys Pro Lys Lys Pro Leu Thr Ser
20      25      30
Ser Ser Ala Ala Pro Gln Arg Pro Ile Ser Thr Gln Arg Thr Ala Ala
35      40      45
Ala Pro Lys Ala Gly Pro Gly Val Val Arg Lys Asn Pro Gly Val Gly
50      55      60
Asn Gly Asp Asp Glu Ala Ala Glu Leu Met Gln Gln Val Asn Val Leu
65      70      75      80
Lys Leu Thr Val Glu Asp Leu Glu Lys Glu Arg Asp Phe Tyr Phe Gly
85      90      95
Lys Leu Arg Asn Ile Glu Leu Ile Cys Gln Glu Asn Glu Gly Glu Asn
100     105     110
Asp Pro Val Leu Gln Arg Ile Val Asp Ile Leu Tyr Ala Thr Asp Glu
115     120     125
Gly Phe Val Ile Pro Asp Glu Gly Gly Pro Gln Glu Glu Gln Glu Glu
130     135     140
Tyr
145

```

<210> 7

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 739 525 T3

Met Arg Glu Cys Ile Ser Ile His Val Gly Gln Ala Gly Val Gln Ile
1 5 10 15
Gly Asn Ala Cys Trp Glu Leu Tyr Cys Leu Glu His Gly Ile Gln Pro
20 25 30
Asp Gly Gln Met Pro Ser Asp Lys Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asp Ser
35 40 45
Phe Asn Thr Phe Phe Ser Glu Thr Gly Ala Gly Lys His Val Pro Arg
50 55 60
Ala Val Phe Val Asp Leu Glu Pro Thr Val Ile Asp Glu Val Arg Thr
65 70 75 80
Gly Thr Tyr Arg Gln Leu Phe His Pro Glu Gln Leu Ile Thr Gly Lys
85 90 95
Glu Asp Ala Ala Asn Asn Tyr Ala Arg Gly His Tyr Thr Ile Gly Lys
100 105 110
Glu Ile Ile Asp Leu Val Leu Asp Arg Ile Arg Lys Leu Ala Asp Gln
115 120 125
Cys Thr Arg Leu Gln Gly Phe Leu Val Phe His Ser Phe Gly Gly Gly
130 135 140
Thr Gly Ser Gly Phe Thr Ser Leu Leu Met Glu Arg Leu Ser Val Asp
145 150 155 160
Tyr Gly Lys Lys Ser Lys Leu Glu Phe Ser Ile Tyr Pro Ala Pro Gln
165 170 175
Val Ser Thr Ala Val Val Glu Pro Tyr Asn Ser Ile Leu Thr Thr His
180 185 190
Thr Thr Leu Glu His Ser Asp Cys Ala Phe Met Val Asp Asn Glu Ala
195 200 205
Ile Tyr Asp Ile Cys Arg Arg Asn Leu Asp Ile Glu Arg Pro Thr Tyr
210 215 220
Thr Asn Leu Asn Arg Leu Ile Ser Gln Ile Val Ser Ser Ile Thr Ala
225 230 235 240
Ser Leu Arg Phe Asp Gly Ala Leu Asn Val Asp Leu Thr Glu Phe Gln
245 250 255
Thr Asn Leu Val Pro Tyr Pro Arg Ile His Phe Pro Leu Ala Thr Tyr
260 265 270
Ala Pro Val Ile Ser Ala Glu Lys Ala Tyr His Glu Gln Leu Ser Val
275 280 285
Ala Asp Ile Thr Asn Ala Cys Phe Glu Pro Ala Asn Gln Met Val Lys
290 295 300
Cys Asp Pro Gly His Gly Lys Tyr Met Ala Cys Cys Leu Leu Tyr Arg
305 310 315 320
Gly Asp Val Val Pro Lys Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Thr Ile Lys
325 330 335
Thr Lys Arg Thr Ile Gln Phe Val Asp Trp Cys Pro Thr Gly Phe Lys
340 345 350
Val Gly Ile Asn Tyr Gln Pro Pro Thr Val Val Pro Gly Gly Asp Leu
355 360 365
Ala Lys Val Gln Arg Ala Val Cys Met Leu Ser Asn Thr Thr Ala Ile
370 375 380
Ala Glu Ala Trp Ala Arg Leu Asp His Lys Phe Asp Leu Met Tyr Ala
385 390 395 400
Lys Arg Ala Phe Val His Trp Tyr Val Gly Glu Gly Met Glu Glu Gly
405 410 415
Glu Phe Ser Glu Ala Arg Glu Asp Met Ala Ala Leu Glu Lys Asp Tyr
420 425 430
Glu Glu Val Gly Val Asp Ser Val Glu Gly Glu Gly Glu Glu Glu Gly
435 440 445
Glu Glu Tyr
450

<210> 8

5 <211> 444

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 739 525 T3

Met Arg Glu Ile Val His Ile Gln Ala Gly Gln Cys Gly Asn Gln Ile
1 5 10 15
Gly Ala Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp Glu His Gly Ile Asp Pro
20 25 30
Thr Gly Thr Tyr His Gly Asp Ser Asp Leu Gln Leu Asp Arg Ile Ser
35 40 45
Val Tyr Tyr Asn Glu Ala Thr Gly Gly Lys Tyr Val Pro Arg Ala Ile
50 55 60
Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg Ser Gly Pro
65 70 75 80
Phe Gly Gln Ile Phe Arg Pro Asp Asn Phe Val Phe Gly Gln Ser Gly
85 90 95
Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu
100 105 110
Val Asp Ser Val Leu Asp Val Val Arg Lys Glu Ala Glu Ser Cys Asp
115 120 125
Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser Leu Gly Gly Thr Gly
130 135 140
Ser Gly Met Gly Thr Leu Ile Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Pro
145 150 155 160
Asp Arg Ile Met Asn Thr Phe Ser Val Val Pro Ser Pro Lys Val Ser
165 170 175
Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr Leu Ser Val His Gln Leu
180 185 190
Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Tyr Cys Ile Asp Asn Glu Ala Leu Tyr
195 200 205
Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Arg Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Gly Asp
210 215 220
Leu Asn His Leu Val Ser Gly Thr Met Glu Cys Val Thr Thr Cys Leu
225 230 235 240
Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu Arg Lys Leu Ala Val Asn
245 250 255
Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe Met Pro Gly Phe Ala Pro
260 265 270
Leu Thr Ser Arg Gly Ser Gln Gln Tyr Arg Ala Leu Thr Val Pro Asp
275 280 285
Leu Thr Gln Gln Val Phe Asp Ala Lys Asn Met Met Ala Ala Cys Asp
290 295 300
Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala Ala Val Phe Arg Gly Arg
305 310 315 320
Met Ser Met Lys Glu Val Asp Glu Gln Met Leu Asn Val Gln Asn Lys
325 330 335
Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro Asn Asn Val Lys Thr Ala
340 345 350
Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys Met Ala Val Thr Phe Ile
355 360 365
Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe Lys Arg Ile Ser Glu Gln
370 375 380
Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe Leu His Trp Tyr Thr Gly
385 390 395 400
Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu Ala Glu Ser Asn Met Asn
405 410 415
Asp Leu Val Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Thr Ala Glu Glu
420 425 430
Glu Glu Asp Phe Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala
435 440

<210> 9

<211> 150

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 739 525 T3

```

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1          5          10          15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20          25          30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35          40          45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50          55          60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65          70          75          80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85          90          95
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100         105         110
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115         120         125
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130         135         140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys
145         150

```

<210> 10

<211> 441

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 739 525 T3

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 11

5 <211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser
 1 5 10 15
 Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

ES 2 739 525 T3

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 12

Val	Gln	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Gln	Ser	Lys
1				5					10					15	
Cys	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Lys	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	
			20					25					30		

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 13

Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Lys
1				5					10					15	
Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	
			20					25					30		

<210> 14

<211> 32

15 <212> PRT

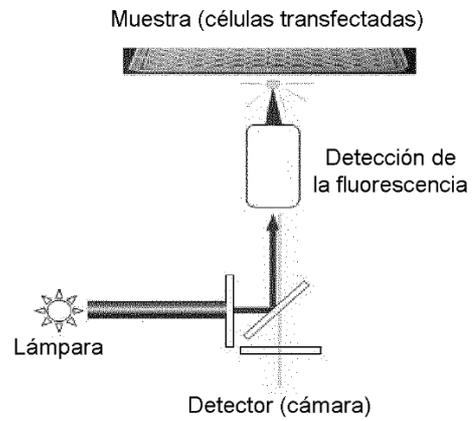
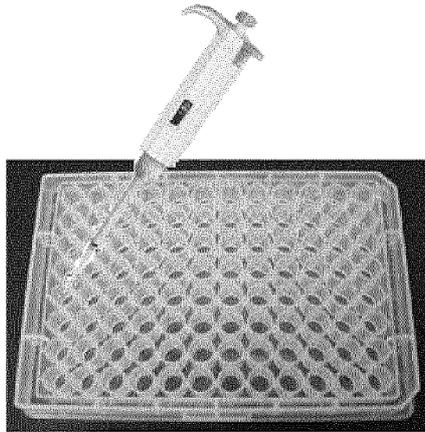
<213> Homo sapiens

<400> 14

Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Gln	Ser
1				5					10					15	
Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn
			20					25					30		

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una interacción entre uno o más cebos proteicos y una o más presas candidatas en una célula eucariota, que comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar una célula eucariota que expresa (i) uno o más cebos proteicos, y (ii) una o más presas candidatas, en la que dicho cebo proteico comprende un resto de cebo y un resto de unión a tubulina polimerizada,
- 10 b) determinar la aparición de una interacción entre el mencionado uno o más cebos proteicos y la mencionada una o más presas candidatas en la célula eucariota, en el que el mencionado cebo proteico está unido a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha interacción.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho cebo proteico comprende:
- un resto de unión a tubulina polimerizada, que comprende uno o más Dominios de Unión a Microtúbulos (MBD), y
 - un resto de cebo.
- 15 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho cebo proteico comprende una región Enlazadora (L) situada entre el resto de unión a tubulina polimerizada y el resto de cebo.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en el que el Dominio de Unión a Microtúbulos se selecciona en un grupo que consiste en: tau de secuencia SEQ ID N°1 y SEQ ID N°10 a 14, MAP1A de secuencia SEQ ID N°2, MAP2 de secuencia SEQ ID N°3, MAP4 de secuencia SEQ ID N°4, MAP6 de secuencia SEQ ID N°5,
- 20 EB-1 de secuencia SEQ ID N°6, y/o cualquier Dominio de Unión a Microtúbulos que deriva de proteínas asociadas a los microtúbulos, y fragmentos, y combinaciones de los mismos.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la presa candidata comprende una proteína fluorescente.
- 25 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en la etapa b), la determinación de la aparición de dicha presa en la célula eucariota es un método de detección seleccionado en un grupo que comprende: unión a un anticuerpo, hibridación con un ácido nucleico, medida de la fluorescencia.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, antes de la etapa b), una etapa de despolimerización de la tubulina celular usando un fármaco despolimerizante de los microtúbulos, o exposición al frío.
- 30 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula, en la etapa b), es una célula fijada o una célula viva.
9. Uso de un resto de unión a tubulina polimerizada fusionado a uno o más cebos, como una herramienta para determinar la aparición de una interacción entre dicho uno o más cebos y una o más presas candidatas en una célula eucariota, en el que dicho cebo está unido a tubulina polimerizada en la célula eucariota, localizando de ese modo dicha una o más presas candidatas a lo largo de dicha tubulina polimerizada, detectando de ese modo dicha interacción.
- 35



Transfección de muestras celulares

Formación de imágenes mediante fluorescencia básica

YB-1-GFP-tau

Sondas de poli-T marcadas con Cy3

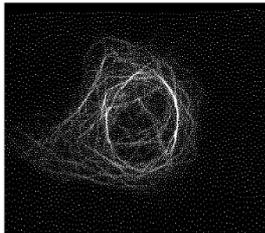


Imagen del cebo
YB-1-GFP-tau se une a los microtúbulos

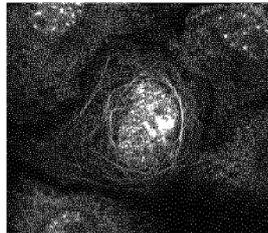
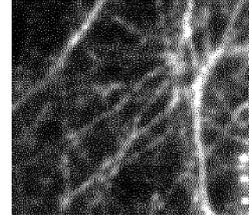
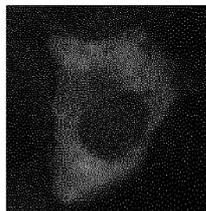


Imagen de la presa:
ARNm que usa poli-T con sonda de Cy3



En la célula que expresa YB-1-GFP-tau se observan claramente estructuras microtubulares en la imagen de la presa

YB-1-GFP



Control: YB-1-GFP se distribuye homogéneamente

Detección

Figura 1

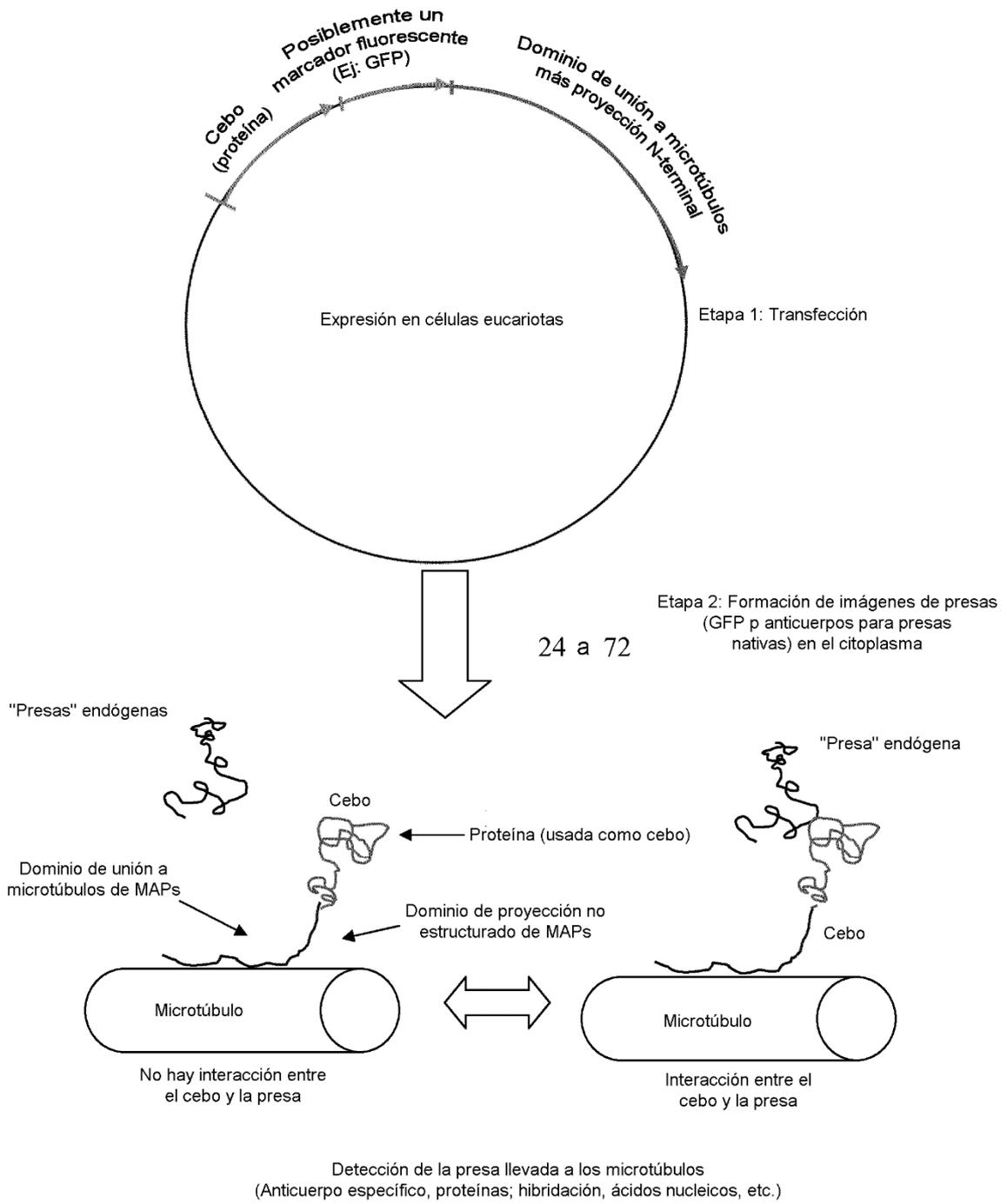


Figura 2

Etapa 1: Cotransfección

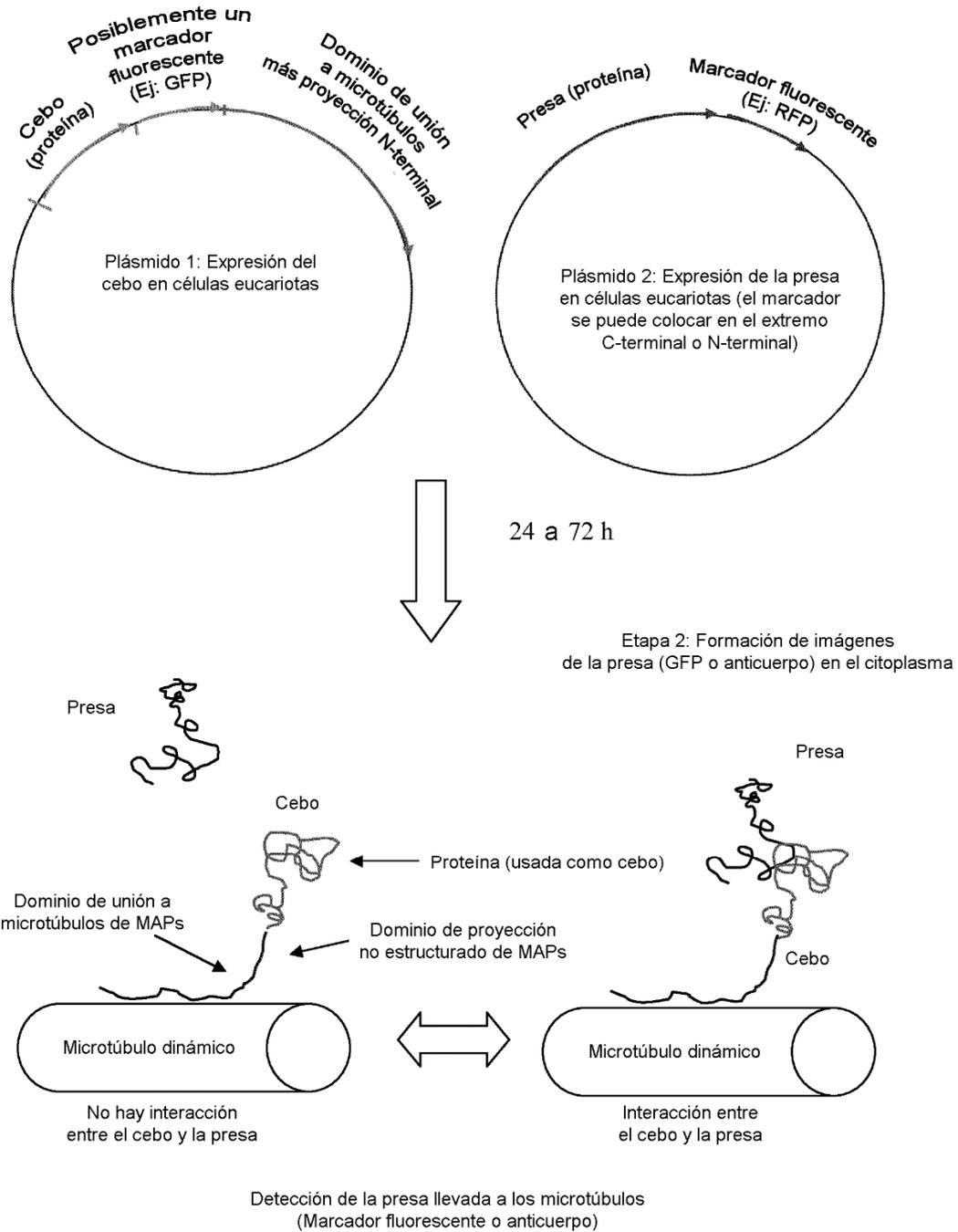


Figura 3

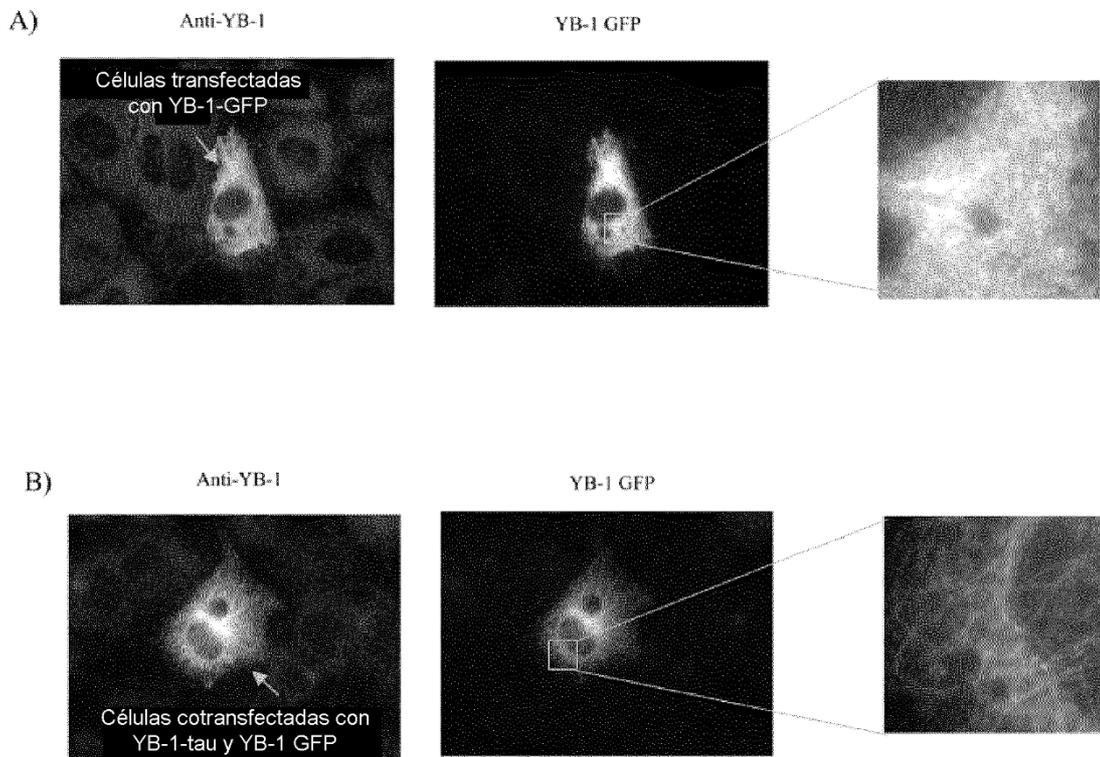
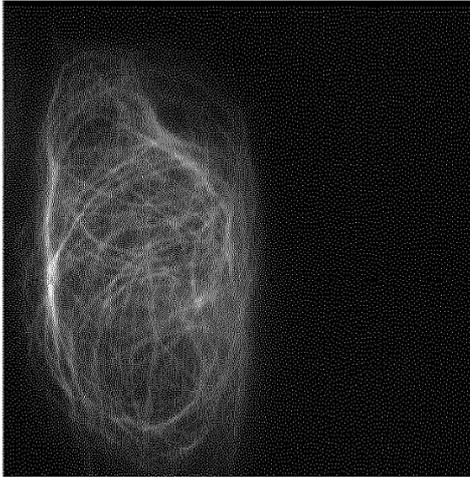


Figura 4

YB-1-GFP-Tau



Anti-TIA-1

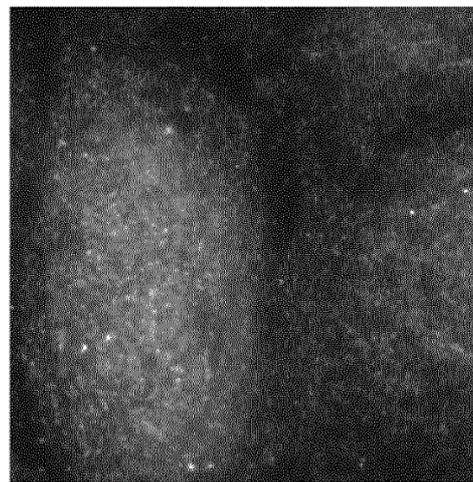


Figura 5

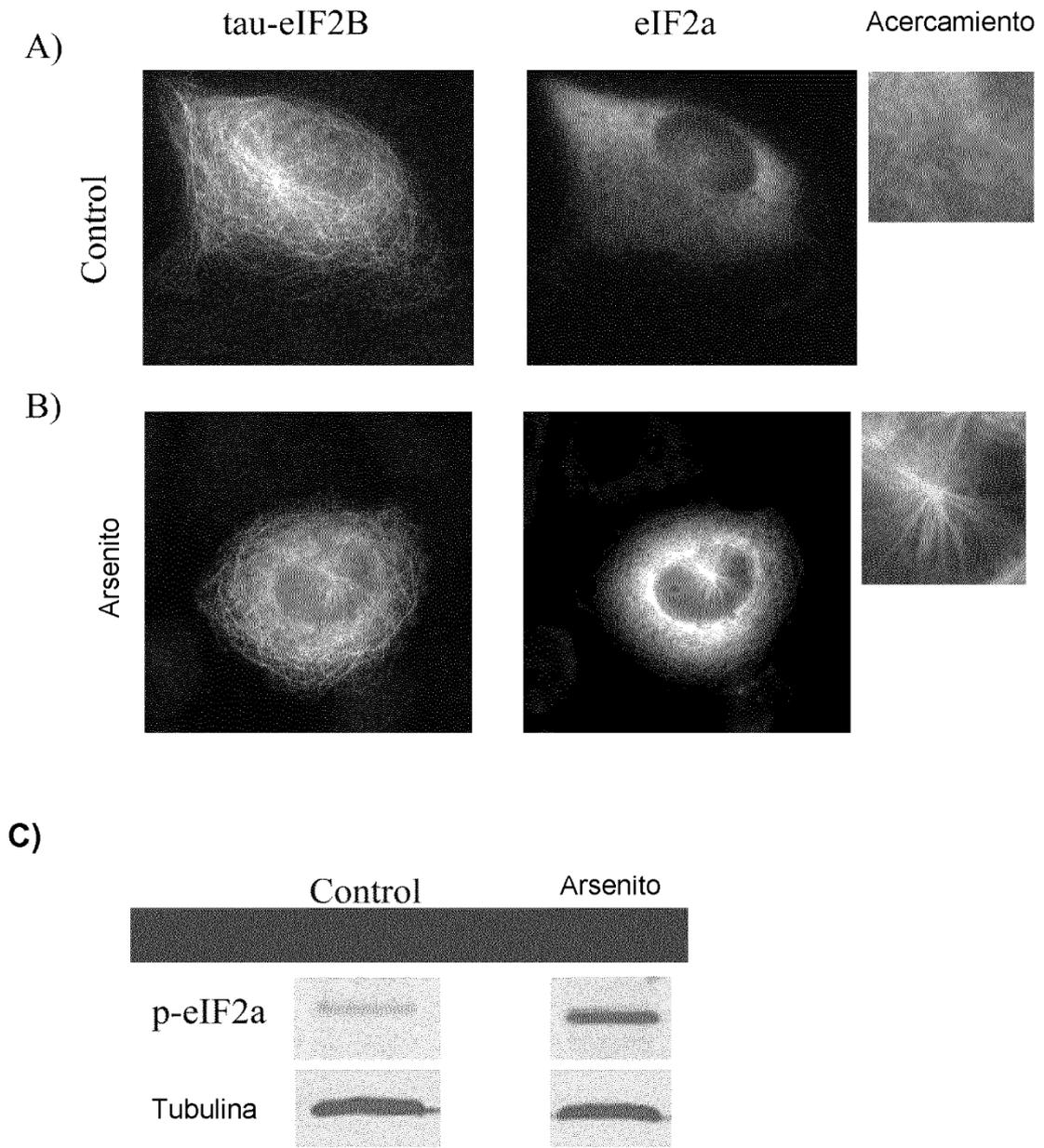


Figura 6

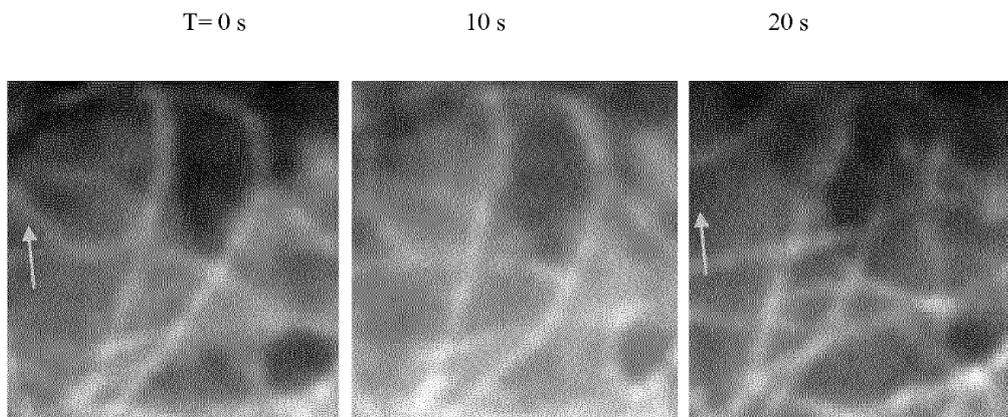


Figura 7

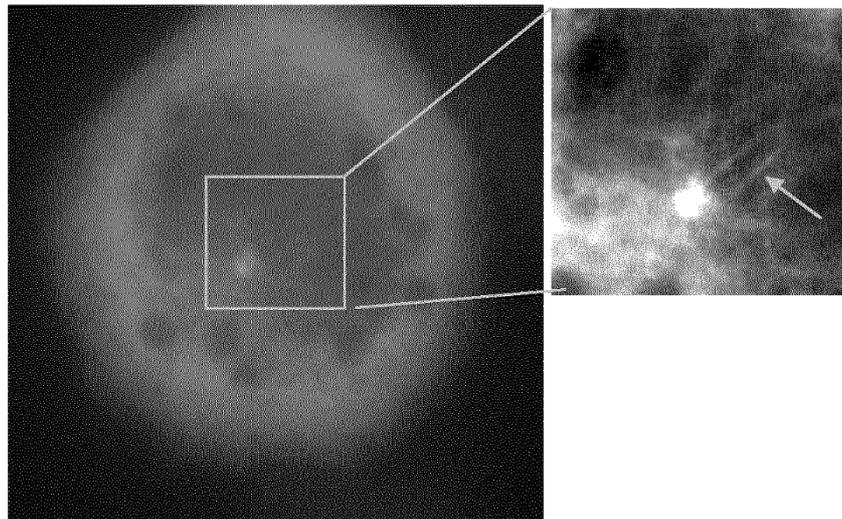


Figura 8