

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 874**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2014** **PCT/CA2014/050539**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014** **WO14197986**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2014** **E 14810600 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020** **EP 3008213**

54 Título: **Detección de interacciones proteína a proteína**

30 Prioridad:

10.06.2013 US 201361833304 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2021

73 Titular/es:

**THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY
OF TORONTO (100.0%)
The Banting Institute 100 College Street, Suite
419
Toronto, Ontario M5G 1L7, CA**

72 Inventor/es:

**STAGLJAR, IGOR;
PETSCHNIGG, JULIA y
GROISMAN, BELLA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 811 874 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

Detección de interacciones proteína a proteína

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a reactivos novedosos para métodos de detección de interacciones proteína-proteína con un sistema genético in vivo de mamífero.

10 Antecedentes de la invención

Las proteínas de membrana desempeñan papeles vitales en muchas facetas de la biología y, debido a su asociación con una variedad de enfermedades, son de gran interés terapéutico⁽¹⁾. La comprensión mecanicista de la función de la proteína de membrana depende críticamente del conocimiento de sus interacciones físicas y organización en complejos de múltiples proteínas. A pesar de la extensa investigación realizada en la última década, existe una falta de información detallada sobre los diversos asociados interactuantes de estas proteínas integrales de membrana, principalmente debido a sus características bioquímicas, enorme complejidad y multiplicidad⁽²⁾. En consecuencia, esto representa un obstáculo importante en los intentos de investigar la biología de la desregulación de las proteínas integrales de la membrana que conducen a numerosas enfermedades humanas como cáncer, fibrosis quística, trastornos cardiovasculares y neurodegenerativos y, por lo tanto, también se convierten en un obstáculo para diseñar mejores terapias dirigidas.

Para abordar los problemas mencionados anteriormente con respecto al análisis proteómico de las proteínas integrales de membrana, los inventores desarrollaron previamente el sistema Membrane Yeast Two-Hybrid (MYTH) (EP 1348766), una tecnología basada en levaduras para la identificación de interactores de proteínas integrales de membrana de un organismo de interés⁽³⁾. Desde su desarrollo, MYTH se ha aplicado con acierto para estudiar las interacciones proteína-proteína (PPI) entre diversas proteínas de membrana de levaduras, plantas, gusanos y humanos⁽⁴⁻¹⁰⁾.

30 Documentos relacionados de la técnica anterior identificados por las autoridades de búsqueda durante el trámite

El documento WO 02/27020 se refiere a un método para detectar interacciones proteína-proteína (PPI) de membrana con un sistema de levadura in vivo, denominado Membrane Yeast Two-Hybrid (MYTH). El ensayo MYTH del documento WO 02/27020 proporciona lectura en forma de sí/no, es decir, si existe o no interacción entre dos proteínas. Como tal, el método del documento WO 02/27020 no es capaz de medir cuantitativamente una interacción entre dos proteínas.

El documento EP 1 808 495 se refiere a un método para detectar PPI de membrana con un sistema de levadura in vivo, denominado MYTH. El ensayo MYTH del documento EP 1 808 495 proporciona lectura en forma de sí/no, es decir, si existe o no interacción entre dos proteínas. Como tal, el ensayo del documento EP 1 808 495 no es capaz de proporcionar un análisis cuantitativo que mida una interacción entre dos proteínas.

El documento EP 1 348 766 se refiere a un método para detectar PPI de membrana con un sistema de levadura in vivo, denominado MYTH. El ensayo MYTH del documento EP 1 348 766 proporciona lectura en forma de sí/no, es decir, si existe o no interacción entre dos proteínas. Como tal, el ensayo del documento EP 1 348 766 no es capaz de proporcionar un análisis cuantitativo que mida una interacción entre dos proteínas.

Xiaoying Chen et al., ("Fusion protein linkers: Property, design and functionality", Advanced Drug Delivery Reviews, 1 September 2012) es una revisión de los enlazadores de proteínas de fusión y resume ejemplos de su diseño y aplicación.

Dingyi Wen et al. ("Discovery and Investigation of O-Xylosylation in Engineered Proteins Containing a (GGGGS)_n linker", Analytical Chemistry, vol. 85, no. 9, May 2013, pages 4805-4812) informa que la O-xilosilación en el residuo de serina en los enlazadores GGGGS es una modificación postraduccion común para los enlazadores GGGGS.

Un artículo de revisión de Stagljar, I. ("Interactive proteomics with MYTH: identifying protein puzzles and putting them into their correct cellular pathway.", IMS Magazine, 26 July 2012) describe el sistema MYTH y sus ventajas para identificar a los interactores de proteínas de membrana en un entorno in vivo. En el segundo último párrafo, este artículo de revisión hace una referencia no habilitante a una versión mamífera de MYTH llamada MaMTH. Sin embargo, este artículo de revisión no revela qué es MaMTH, ni que MaMTH pueda usarse en un método para medir cuantitativamente los PPI, ni el uso de enlazadores adecuados para enlazar las proteínas de cebo y presa a CbM o NbM.

65 Antecedentes adicionales de la invención

A pesar del hecho de que MYTH es un sistema potente y robusto adecuado para mapear las interacciones de una amplia gama de proteínas de membrana, la amplia experiencia de los inventores en proteómica de membrana durante los últimos 10 años les ha enseñado que muchas proteínas de membrana integral de mamíferos no pueden ser analizadas usando MYTH. Una limitación potencialmente significativa es el organismo huésped, la levadura, que se usa para identificar los PPI de membrana. Específicamente, la levadura no lleva a cabo algunas de las modificaciones postraduccionales (por ejemplo, la mayoría de los eventos de fosforilación de tirosina, así como algunos eventos de glicosilación) que son responsables de mediar los PPI entre muchas proteínas integrales de membrana. Además, la composición del medio celular de la levadura y la membrana en particular (por ejemplo, ergosterol en lugar de colesterol) es diferente de la de los mamíferos, lo que puede dar lugar a una localización inadecuada de las proteínas integrales de la membrana de los mamíferos en la levadura⁽¹¹⁾. Además, se ha descubierto que varias proteínas de membrana integral de mamíferos son tóxicas cuando se expresan en levadura (Stagljär, I., datos no publicados). Por último, aunque la levadura es un organismo modelo popular para dilucidar los PPI, no es ideal para el descubrimiento de fármacos, como la identificación de fármacos de moléculas pequeñas que pueden alterar un PPI de importancia terapéutica⁽¹²⁾. Todos los hechos mencionados anteriormente limitan nuestra capacidad para detectar PPI entre las proteínas integrales de membrana de los mamíferos y sus asociados que interactúan a través de MYTH y nos impiden usar MYTH como una herramienta de descubrimiento de fármacos. Por lo tanto, el análisis exitoso de los PPI que involucran proteínas de membrana integral de mamíferos requiere el desarrollo de una nueva tecnología que pueda detectar estas interacciones en su entorno de membrana natural. Tal sistema genético diseñado en un organismo huésped de mamífero aliviaría muchas de las preocupaciones mencionadas anteriormente y proporcionaría un método atractivo para descubrir los roles biológicos de muchas proteínas de membrana integral de mamíferos, que no pueden estudiarse en levaduras.

La transferencia del sistema MYTH de levadura original a células de mamífero no es trivial y requiere una ingeniería y modificación de proteínas significativas, ya que el uso de reactivos MYTH originales no es compatible para células de mamífero.

Por consiguiente, lo que se necesita es un sistema genético que pueda sondear los PPI que involucran proteínas de membrana integral de mamíferos, pueda detectar PPI mediados por estímulos o moléculas que puedan alterar los PPI, pueda detectar el estado de fosforilación de las proteínas. Estas y otras necesidades, que no pueden ser satisfechas por los sistemas de la técnica anterior, ahora son satisfechas por la presente invención.

Resumen de la invención

La presente divulgación proporciona un método para detectar la interacción entre una primera proteína de membrana o parte de la misma y una segunda membrana o proteína soluble o parte de la misma. En una realización, el método incluye: (a) proporcionar una célula de mamífero huésped que incluye al menos un gen detectable (informador) que tiene un sitio de unión para un factor de transcripción, de modo que el gen detectable expresa un producto detectable; (b) expresar en la célula de mamífero huésped la primera proteína o parte de la misma, uniéndose la primera proteína o parte de la misma a través de un primer enlazador adecuado a un subdominio C-terminal de una ubiquitina humana (Cub) y un factor de transcripción; (c) expresar en la célula de mamífero huésped la segunda proteína o parte de la misma, estando unida la segunda proteína o parte de la misma a un subdominio N-terminal de la proteína ubiquitina humana (Nub) a través de un segundo enlazador adecuado; y (d) determinar si se detecta el producto detectable, siendo la detección del producto detectable indicativa de que la primera proteína y la segunda proteína interactúan.

En una realización, la presente invención proporciona un método para la medición de la interacción entre una primera proteína de membrana o parte de la misma y una segunda membrana o proteína soluble o parte de la misma. El método, en una realización, incluye: (a) proporcionar una célula de mamífero huésped que incluye un gen detectable (informador) que tiene un sitio de unión para un factor de transcripción, de modo que el gen detectable expresa un producto detectable medible cuando el gen detectable se activa transcripcionalmente; (b) expresar en la célula de mamífero huésped la primera proteína o parte de la misma, uniéndose la primera proteína o parte de la misma a través de un primer enlazador adecuado a un subdominio C-terminal de una ubiquitina humana (Cub) y el factor de transcripción; (c) expresar en la célula de mamífero huésped la segunda proteína o parte de la misma, estando unida la segunda proteína o parte de la misma a un subdominio N-terminal de la proteína ubiquitina humana (Nub) a través de un segundo enlazador adecuado; y (d) medir una salida de expresión del producto detectable como una medida de la cantidad de interacción entre la primera y la segunda proteína.

En una realización del método para un método para la medición de la interacción entre una primera proteína de membrana o parte de la misma y una segunda membrana o proteína soluble o parte de la misma, la generación de expresión del producto detectable es emisión de luz y el paso (d) comprende medir la emisión de luz resultante como una medida de la interacción entre la primera y la segunda proteína.

En una realización de los métodos de la presente invención, la etapa (b) comprende introducir en la célula huésped de mamífero como parte de un vector de cebo, un primer gen bajo el control de un promotor, codificando dicho primer gen entre otros la primera proteína o parte de la misma cuyo gen está unido a la secuencia de ADN de un

primer módulo que codifica, entre otros, el Cub, el primer enlazador adecuado entre la primera proteína y el Cub y el factor de transcripción.

5 En otra realización de los métodos de la presente invención, la etapa (c) comprende introducir en la célula huésped de mamífero, como parte de un vector de presa, un segundo gen bajo el control de un promotor, codificando el segundo gen entre otros la segunda proteína o parte de la misma cuyo gen está unido a la secuencia de ADN de un segundo módulo que codifica, entre otros, el Nub y el segundo enlazador adecuado entre la segunda proteína y el Nub.

10 En otra realización de los métodos de la presente invención, el primer y el segundo enlazadores adecuados son sustancialmente idénticos.

En otra realización de los métodos de la presente invención, la segunda proteína o parte de la misma es una proteína de membrana.

15 En otra realización de los métodos de la presente invención, el vector de cebo se mantiene episómicamente en la célula de mamífero huésped o se integra en el genoma de la célula de mamífero huésped.

20 En otra realización de los métodos de la presente invención, el vector presa se mantiene episómicamente en la célula de mamífero huésped o se integra en el genoma de la célula de mamífero huésped.

En otra realización de los métodos de la presente invención, el primer y el segundo enlazadores son un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos (GGGS)_n, en donde "n" es un número entero igual o mayor que 1.

25 En otra realización de los métodos de la presente invención, el primer y el segundo enlazador es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos (GGGS)_n, en donde "n" es un número entero igual o mayor que 2.

En otra realización de los métodos de la presente invención, el factor de transcripción es un factor de transcripción quimérico seleccionado de mLexA-VP16 y Gal4-ratónNFκB.

30 En otra realización de los métodos de la presente invención, el Nub humano es de tipo salvaje.

En aún otra realización de los métodos de la presente invención, el gen detectable incluye un gen informador fluorescente o un gen informador de luciferasa.

35 En una realización adicional de los métodos de la presente invención, el producto detectable se selecciona de luciferasa de luciérnaga y proteína verde fluorescente (GFP).

40 En otra realización, la presente invención se refiere a un kit de reactivos para detectar la unión entre una primera proteína de membrana o parte de la misma y una segunda membrana o proteína soluble o parte de la misma. El kit, según una realización, incluye: (a) una célula huésped que incluye al menos un gen detectable (informador) que tiene un sitio de unión para un factor de transcripción, de modo que el gen detectable expresa un producto detectable cuando el gen detectable se activa transcripcionalmente; (b) un primer vector (cebo) que comprende un primer sitio que puede recibir un primer ácido nucleico que codifica la primera proteína o parte de la misma de manera que cuando se inserta el primer ácido nucleico se une a la secuencia de ADN de un primer módulo que codifica entre otros, un subdominio C-terminal de una proteína ubiquitina humana (Cub), un primer enlazador adecuado entre la primera proteína y el Cub, el primer módulo que comprende además un ácido nucleico para el factor de transcripción y un promotor; (c) un segundo vector (presa) que comprende un segundo sitio que puede recibir un segundo ácido nucleico que codifica la segunda proteína o parte de la misma de manera que cuando se inserta el segundo ácido nucleico se une a la secuencia de ADN de un segundo módulo que codifica entre otros, un subdominio N-terminal de la proteína ubiquitina humana (Nub) y un segundo enlazador adecuado entre la segunda proteína y el Nub, en donde el segundo módulo comprende además un promotor.

55 En una realización del kit, el primer y el segundo enlazadores adecuados son sustancialmente idénticos.

En otra realización del kit, la segunda proteína o parte de la misma es una proteína de membrana.

En otra realización del kit, el vector de cebo se mantiene episómicamente en la célula de mamífero huésped o se integra en el genoma de la célula de mamífero huésped.

60 En otra realización del kit, el vector de presa se mantiene episómicamente en la célula de mamífero huésped o se integra en el genoma de la célula de mamífero huésped.

65 En otra realización del kit, el primer y el segundo enlazador es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos (GGGS)_n, en donde "n" es un número entero igual o mayor que 1.

En otra realización del kit de la presente invención, el primer y el segundo enlazador es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos (GGGS)_n, en donde "n" es un número entero igual o mayor que 2.

5 En otra realización del kit, el factor de transcripción es un factor de transcripción quimérico seleccionado de mLexA-VP16 y Gal4-ratónNFKB.

En otra realización más del kit de la presente invención, el Nub humano es de tipo salvaje.

10 En otra realización más del kit de la presente invención, la primera proteína de membrana o parte de la misma y la segunda membrana o proteína soluble o parte de la misma son proteínas de mamífero.

En una realización adicional del kit de la presente invención, el producto detectable se selecciona de luciferasa de luciérnaga y GFP.

15 En otra realización, la presente invención proporciona un método para identificar un agente potencialmente farmacéuticamente activo. El método, en una realización, incluye el uso del kit de las realizaciones anteriores para evaluar la capacidad de un agente de interferir con la interacción proteína-proteína, por lo que la capacidad de interferir con la interacción proteína-proteína es indicativa de que el agente es en potencia farmacéuticamente activo.

20 La presente invención, en otra realización, proporciona un método para proporcionar uno o más compuestos que pueden interferir con la interacción proteína-proteína. El método, en una realización, incluye: (a) proporcionar una célula huésped de mamífero que tenga el vector de presa y el vector de cebo de la presente invención, seleccionándose por lo tanto la primera y segunda proteínas o partes de manera que se sepa que interactúan cuando se expresan; (b) incubar la célula huésped en presencia y ausencia de los compuestos a ensayar; (c) medir la diferencia en la expresión del gen informador entre la incubación que contiene el (los) compuesto(s) por analizar y la incubación libre del (de los) compuesto(s) por analizar; y opcionalmente (d) purificar o sintetizar el compuesto que puede interferir con la interacción proteína-proteína.

25 La presente divulgación también proporciona interactores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El interactor, en una realización, se selecciona del grupo que consiste en las proteínas expresadas por los genes SOCS6, GRAP2, STAT2, CD33, S100A4, TP53, ARRB1, Rgs4, APP, ICP2, TNS3, SHC4, ARRB2, LRP1, MAPK9, FRK, CDC25C, HDAC7, MAP3K3, WASF3, MAPK8, BAIAP2, PTPN18, YWHAB, WASL, FASLG, MED28, SH2D3C, MAPT, SNCA, CDH5, SNX9, PRKCE, YWHAG, TAB1, HCK, SH3GL3, RELA, REPGEF1, TNFRSF1A, NR3C1, IKBKG, PIM1, RAF1, AKT1, CTTN, LAT, NTRK2, ASAP2, CD3E, STAP2, ACTN4, TRAF2, RET, ITK, FGR, PRKCZ, ITGB2, ITSN2, y PTPN22.

30 En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un kit de la presente invención en un proceso de criba para identificar fármacos farmacéuticos.

40 En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un kit de la presente invención en la criba del estado de fosforilación de la primera o segunda proteínas.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de los métodos y kits de la presente divulgación, la primera y/o la segunda proteína es/son tóxicas para levaduras; o las proteínas primera y/o segunda requieren modificaciones postraduccion que no son realizadas por levaduras.

Se realizarán otros y adicionales objetos de la invención a partir del siguiente resumen de la invención, la discusión de la invención y las realizaciones y ejemplos de la misma.

50 Breve descripción de los dibujos

Ahora se describirán realizaciones, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos, en los que:

55 La Figura 1 ilustra una configuración y validación de un sistema de dos híbridos de membrana de mamífero (MaMTH) de acuerdo con una realización de la presente invención. El panel (a) es un gráfico que ilustra el sistema MaMTH de la presente invención. El panel (b) ilustra 5xGAL4UAS-luciferasa (arriba) y 8xlexA-ops-luciferasa HEK293T (abajo) células informadoras evaluadas por su rendimiento en MaMTH. El panel (c) son microfotografías que ilustran la localización de la membrana plasmática de cebos ErbB marcados con Cub-GFP-mLexA-VP16; barra de escala = 10 μM. El panel (d) son gráficos que ilustran la validación de MaMTH usando EGFR (gráfico inferior) y cebos ErbB4 (gráfico superior) probados contra interactores conocidos (Shc1, Grb2, Hsp90) y presas de control negativo.

65 Figura 2: (a) Lista de diversas combinaciones de factores de transcripción quiméricos que consisten en un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio de activación transcripcional (AD) que se probaron. (b) Gráfico que ilustra la actividad de luciferasa de combinaciones de factores de transcripción de longitud completa transfectados en líneas celulares estables 5xGAL4-UAS-luciferasa u 8xlexA-ops-luciferasa HEK293T estables. La actividad de luciferasa se

medió 48 h después de la transfección. Las combinaciones de GAL4-DBD (aminoácido 1-147) y mNfκB-AD (aminoácidos 364-550) para células 5xGAL4-AUS-luciferasa (= TF-1) y mLexA-DBD (aminoácidos 1-202) y VP16 - AD (aminoácidos 413-490) para las células 8xlexA-ops-luciferasa (TF-6) se incorporaron en constructos de cebo debido a la mejor actividad de luciferasa en comparación con los controles negativos (se explica la razón para elegir TF-6 sobre TF-5 en la figura 1e). El TF que dio las señales más altas en 5xGAL4-UAS-luciferasa o en 8xlexA-ops-luciferasa células informadoras estables se estableció en 100 %. (c) La lista de diversas regiones enlazadoras entre las mitades C o N-terminales de ubiquitina y la porción de ADNc se clonaron en vectores de presa ErbB4 y cebo Grb2. (d) Gráfico que ilustra las regiones enlazadoras de la Fig. 2 (c) ensayadas para la activación del gen informador en líneas celulares estables de 5xGAL4UAS-luciferasa 48 h después de la transfección. El enlazador que dio la señal de interacción más alta para el control ErbB4-Grb2 se estableció en 100%. (e) Gráfico que ilustra la actividad de luciferasa de versiones humanas y de levadura de Cub y Nub clonadas en vectores de presa ErbB4 y cebo y Grb2 usando varias versiones de Nub que muestran diferentes afinidades por Cub (f) Gráfico que ilustra la actividad de luciferasa usando cebo ErbB4 etiquetado con Cub-LexA-VP16 o Cub-mLexA-VP16, que tiene una mutación adicional en la supuesta secuencia de localización nuclear de LexA31. (g) Gráficos que ilustran las configuraciones finales de cebo, presa y informador.

Figura 3: Microfotografías que ilustran el rendimiento de (a) 5xGAL4UAS-GFP o (b) 8xlexA-ops-GFP HEK293T células indicadoras en MaMTH. La interacción conocida entre ErbB4 y Grb2 o Shc1 se puede detectar en ambas configuraciones de factores de transcripción, mientras que el control negativo (Fabp5) y el cebo solo están cerca del fondo. (c)-(d) Inmunoprecipitación Western que ilustra la activación del gen informador debido a los TF escindidos usando el anticuerpo VP16 (para cebos con mLexA-VP16-TF; panel (d)) o el anticuerpo V5 (para cebos con GAL4-NfκB-TF; panel (c)). Nótese que ErbB4-Cub-GAL4-NfκB muestra una mayor actividad de fondo en el control de solo cebo debido a una mayor autoactivación. (e)-(f) Los perfiles FACS muestran el porcentaje de población positiva a GFP de cada par de interacción.

Figura 4. Gráficos y microfotografías que ilustran el uso de MaMTH para controlar las interacciones dependientes de agonistas de β2-AR. (a) Gráfico que ilustra la actividad de luciferasa relativa de cebo β2-AR y presa de β-arrestina cotransfectada en células indicadoras de luciferasa 8xlexAops estables HEK293T. La actividad relativa de la luciferasa se basa en el aumento del cambio de multiplicidad por encima de los controles negativos promediados. (b) Gráfico que ilustra la actividad relativa de luciferasa de cebo de tipo salvaje β2-AR y cebos mutantes que carecen de sitios de fosforilación GRK6-, GRK2 o GRK2+GRK6 y presa de β-arrestina cotransfectada en células indicadoras de luciferasa 8xlexAops estables HEK293T. La actividad relativa de la luciferasa se basa en el aumento del cambio de multiplicidad por encima de los controles negativos promediados. (c) Análisis de Inmunoprecipitación Western usando anti-VP16 (para probar la expresión de cebo) y anticuerpos anti-tubulina. (d) Microfotografías que ilustran la localización celular de mutaciones del sitio fosfo (sitios GRK2, GRK6 o GRK2/GRK6) en el constructo del cebo β2AR. Barra de escala = 10 μM.

Figura 5: (a) Análisis de Inmunoprecipitación Western de las proteínas que se muestran en la tabla etiquetadas con Cub-mLexA-VP16 o Cub-GAL4-mNfκB y se utilizan para estudios de interacción. La expresión se probó para ambas configuraciones de factor de transcripción, solo se muestra bait-Cub-GAL4-mNfκB. (b) Gráficos que ilustran la actividad de luciferasa de ErbB2/células dobles estables de luciferasa (en ambas configuraciones de factor de transcripción) infectadas con las presas indicadas; los ensayos de luciferasa se realizaron 4 días después de la infección. (c) Gráficos que ilustran la actividad de luciferasa de células ErbB4 o EGFR-Cub-mLexA-VP16- dobles estables de luciferasa infectadas con presas indicadas; los ensayos de luciferasa se realizaron 4 días después de la infección. (d) Gráficos que ilustran la actividad de luciferasa de las células indicadoras de luciferasa 5xGAL4UAS- u 8xlexAops-cotransfectadas conjuntamente con cebos GABBR1 (dos gráficos superiores) o TGFβR1 (dos gráficos inferiores) y presas indicadas; actividad de luciferasa ensayada 48 h después de la transfección. (e) Gráficos que ilustran la actividad de luciferasa de células indicadoras de luciferasa 5xGAL4UAS estables cotransfectadas con cebos ACBD1, ErbB3 o ACVR1 y presas indicadas; ensayado para la actividad de luciferasa 48 h después de la transfección.

Figura 6. Gráficos que ilustran la monitorización de las interacciones dependientes de fosforilación de los miembros de la familia de ErbB oncogénicos. (a) Panel izquierdo: actividad de luciferasa relativa de las células indicadoras de luciferasa 5xGAL4UAS-HEK293T estables cotransfectadas con varios cebos ErbB oncogénicos y presas Shc1. (a) Panel derecho: actividad de luciferasa relativa de las células indicadoras de luciferasa 5xGAL4UAS-HEK293T estables cotransfectadas con variantes oncogénicas de EGFR (L858R y G719S). (b) Actividad de luciferasa de las células indicadoras de luciferasa 5xGAL4UAS-HEK293T cotransfectadas con cebos muertos EGFR-Wt, EGFR-L858R o EGFR-D855A-quinasa y presa adaptadora Shc1. (c) - (d) Inmunoprecipitación Western que muestra la expresión de diversos receptores usando anticuerpos anti-V5 y anticuerpos específicos de fósforo-tirosina. (e) Gráfico que ilustra el cambio en la actividad de luciferasa de las células informadoras HEK293T 5xGAL4UAS-luciferasa estables cotransfectadas con EGFR-Wt, EGFR-L858R o EGFR-exón19del y la presa Shc1 a diferentes concentraciones de Erlotinib. (f) Gráfico que compara el cambio en la actividad de luciferasa de EGFR-L858R, EGFR-exón19del y el mutante resistente a erlotinib EGFR-L858R/T790A en comparación con EGFR-Wt con respecto a la unión a Shc1 tras el tratamiento con erlotinib. (g) Gráfico que ilustra la actividad de luciferasa de las células informadoras HEK293T 5xGAL4UAS-luciferasa estables transfectadas con EGFR-Wt, EGFR-L858R, EGFR-exón19del y EGFR-L858R/T790M y analizadas para determinar la unión a Shc1 en medios que contienen suero sin

Erlotinib. (h) Análisis de Inmunoprecipitación Western de EGFR-Wt, EGFR-L858R, EGFR-exón19de y EGFR-L858R/T790A cebos transfectados en células indicadoras 5xGAL4UAS-luciferasa HEK293T estables en medios que contienen suero. Después de la transfección, se añadió Erlotinib a las concentraciones indicadas y las células se sometieron a lisis después del tratamiento y se realizó un análisis de Inmunoprecipitación Western usando anticuerpos anti-EGFR y anti-fosfo-EGFR.

Figura 7: (a) Gráfico que ilustra la actividad de luciferasa relativa de los PPI estimulados con suero. Las líneas celulares indicadoras de luciferasa 5xGAL4UAS estables se cotransfectaron con cebo ErbB2 y presas. La actividad de luciferasa se midió 24 h después de la transfección en ausencia/presencia de suero. Se detectaron interacciones dependientes de suero para Grb2, Shc1 y Hsp90. Los valores trazados representan señales de luciferasa relativa calculadas como aumento de cambio de multiplicidad por encima de los controles negativos promediados. (b) Gráfico que ilustra la actividad de luciferasa relativa de las interacciones proteína-proteína inhibidas por el fármaco. Después de la transfección, se midió la interacción de ErbB4 con Shc1 o Pex13 no interactuante en presencia/ausencia de TKI-PD158780 no específico. Los valores graficados representan señales relativas de luciferasa calculadas como aumento de cambio de multiplicidad por encima de los controles de cebo solamente.

Figura 8 (a) Las inmunoprecipitaciones Western que usan anticuerpos V5 para probar la expresión de cebo muestran que los mutantes se expresan de manera similar como tipo salvaje. (b) Gráfico que ilustra el cambio en la actividad de luciferasa. Las células informadoras 5xGAL4UAS-luciferasa HEK293T estables se cotransfectaron con EGFR-L858R o EGFR-exón19del. Las células se cultivaron a las concentraciones indicadas de erlotinib y los ensayos de luciferasa se realizaron 20 h después del tratamiento. El mutante EGFR-exón19del muestra una unión reducida de Shc1 a partir de 5-7 nM, en contraste con EGFR-L858R. (c) Gráfico que ilustra la actividad de luciferasa de las células informadoras HEK293T 5xGAL4UAS-luciferasa estables transfectadas con EGFR-L858R, EGFR-exón19del y analizadas para determinar la unión a Shc1 en medios que contienen suero sin Erlotinib.

La Figura 9 MaMTH permite la detección sensible de los PPI que utilizan el sitio de unión Y-X-N Grb2 en miembros de la familia ErbB. (a) Lista de fosfo-mutantes de la familia ErbB generados implicados en la unión a Grb2. (b) Gráfico que ilustra la actividad de luciferasa de células indicadoras de luciferasa 5xGAL4UAS estables cotransfectadas con cebos mutantes EGFR-Wt o Y-p (Y1092A o Y1092, Y1138A) con Grb2. La actividad de luciferasa se midió 24 h después de la transfección. EGFR-Y1092A, Y1138A muestra una unión disminuida con el adaptador Grb2. (c) Gráfico que ilustra la interacción dependiente del ligando ErbB2/Grb2 y ErbB3/Grb2. Después de privación de nutrientes durante la noche, las células que expresaban transitoriamente cebos ErbB3 o ErbB2 (Wt o mutados en residuos Y específicos) se trataron con Neuregulina a 10 ng/ml durante 4 h, seguido de la medición de la actividad de luciferasa. Se inhibió la asociación significativa de ErbB3/Grb2 o ErbB2/Grb2 tras la unión del ligando mediante la introducción de mutaciones de dos puntos en los sitios de unión de Grb2. (d) Gráfico que ilustra la interacción dependiente del ligando ErbB2/Shc1 y ErbB3/Shc1. El reclutamiento de Shc1 no se vio afectado en ErbB2-Y1139A tras la unión del ligando.

Figura 10 Visualización de transferencia de puntos usando MaMTH para identificar nuevos interactores EGFR-Wt y EGFR-L858R.

Figura 11 Confirmación por LUMIER de interactores MaMTH y superposición de eliminación de ARNsh. (a) Los mejores interactores de MaMTH (basados en la puntuación de interacción de MaMTH) fueron probados por LUMIER. (b) Los gráficos que ilustran los aciertos de MaMTH confirmados por LUMIER se muestran con respecto a su tasa de deserción de ARNsh ($\text{fdr} < 0.3$) en células tratadas con Erlotinib. Las barras negras indican genes enriquecidos (que conducen a una mejor supervivencia), mientras que las barras grises indican genes agotados (que conducen a una menor supervivencia).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que se definirán con los significados a continuación. Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, dimensiones y peso, incluidos los rangos, son aproximaciones que generalmente pueden variar (+) o (-) en incrementos de 0.1, 1.0 o 10.0, según corresponda. Todas las designaciones numéricas pueden entenderse precedidas por el término "aproximadamente".

Los términos no limitativos no deben interpretarse como limitativos a menos que se indique expresamente o el contexto indique claramente lo contrario (por ejemplo, "incluyendo", "que tiene" y "que comprende" típicamente indican "incluyendo sin limitación"). Las formas singulares incluidas en las reivindicaciones tales como "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia plural a menos que se indique expresamente lo contrario. Con el fin de ayudar en la comprensión y preparación de la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos ilustrativos, no limitativos.

El término "Nub", como se usa en el presente documento, se refiere a la porción N-terminal de la ubiquitina humana, que abarca los aminoácidos 1-37 de la ubiquitina humana. "Nub" contiene los aminoácidos 1-37 de la ubiquitina

humana de tipo salvaje, o los aminoácidos 1-37 de la ubiquitina mutada. Por ejemplo, "Nub/" se refiere a una forma de tipo salvaje de Nub. "NubV es una forma mutada de Nubl, en la que el aminoácido isoleucina en la posición 13 se ha cambiado por una valina.

- 5 El término "Cub" se usa para referirse a la porción C-terminal de la ubiquitina humana, que abarca los aminoácidos 35-76 de la ubiquitina humana.

10 El término "cebo" tal como se usa en este documento define una fusión de un polipéptido y uno o más de otros polipéptidos, uno de los cuales es una primera secuencia de proteína implicada en la degradación de la proteína intracelular tal como Cub. El cebo se puede usar en el sistema de dos híbridos de membrana de mamífero (MaMTH) de la presente invención para investigar las interacciones entre dicho cebo y una o varias presas.

15 El término "vector de cebo" como se usa en este documento se refiere a un constructo de ácido nucleico que contiene secuencias que codifican el "cebo" y secuencias reguladoras que son necesarias para la transcripción y traducción de las secuencias codificadas por la célula huésped, y preferiblemente secuencias reguladoras que son necesarias para la propagación del constructo de ácido nucleico en células de mamífero. Preferiblemente, el "vector de cebo" también codifica el activador del gen o genes informadores del huésped.

20 El término "presa", como se usa en este documento, define una fusión entre un polipéptido y uno o más polipéptidos, uno de los cuales es una segunda secuencia de proteína implicada en la degradación de la proteína intracelular tal como Nub. Nub puede ser Nub de tipo salvaje (Nubl) o una versión mutada de Nub, donde uno o varios de sus aminoácidos han sido reemplazados por otros aminoácidos, como se describe en detalle para "Nub" arriba.

25 Los términos "vector de presa" y "vector de biblioteca" tal como se usan en el presente documento se refieren a un constructo de ácido nucleico que contiene secuencias que codifican la "presa" y secuencias reguladoras que son necesarias para la transcripción y traducción de las secuencias codificadas que codifica el huésped células, y preferiblemente secuencias reguladoras que son necesarias para la propagación del constructo de ácido nucleico en E. coli.

30 El término "ubiquitina dividida", como se usa en el presente documento, se refiere a ubiquitina humana cuasintativa ensamblada a partir de Nub y Cub no unidos covalentemente, que se han acercado espacialmente por la interacción de dos polipéptidos no relacionados que se fusionan con Cub y Nub respectivamente. La ubiquitina dividida es reconocida por las proteasas específicas de ubiquitina presentes en la célula de mamífero, que atacan la cadena polipeptídica C-terminal al motivo de doble glicina en Cub. La escisión proteolítica conduce a la ruptura de la cadena de polipéptidos después del motivo de doble glicina.

35 El término "polipéptido transactivador" o "activador" como se usa en este documento se refiere a cualquier polipéptido que posea la capacidad de activar el "gen informador" de la célula huésped, por ejemplo, reclutando y activando la maquinaria de ARN polimerasa II de células de mamífero.

40 El término "mLexA" como se usa en este documento se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína represora bacteriana LexA o su producto de traducción, donde la secuencia puede codificar la secuencia LexA de tipo salvaje o un LexA mutado ("mLexA") secuencia donde el aminoácido arginina en la posición 157 ha sido reemplazado por una glicina o donde el aminoácido arginina en la posición 159 ha sido reemplazado por glutamato o glicina, o cualquier combinación de las dos mutaciones.

El término Gal1-147 usado en este documento se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de levadura Gal4, correspondiente a los aminoácidos 1-147 de su producto de traducción.

50 El término "factor de transcripción artificial" o "factor de transcripción quimérico" como se usa en este documento se refiere a una proteína híbrida que incluye (1) un polipéptido con la capacidad intrínseca de unirse a una secuencia de ácidos nucleicos definida, tal como el represor bacteriano proteína LexA o la proteína de levadura Gal4 o el y (2) cualquier polipéptido transactivador, como se definió anteriormente (VP16 y ratónNFkB).

55 El término "TDA" como se usa en este documento se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o su producto de traducción, que comprende los siguientes elementos: (1) una etiqueta de epítipo que permite la detección inmunológica del polipéptido por medio de un anticuerpo dirigido específicamente contra el epítipo, como la etiqueta V5, la etiqueta HA, la etiqueta 3xFLAG, (2) un factor de transcripción artificial.

60 El término "línea celular informadora", como se usa en este documento, se refiere a cualquier célula huésped que incluye al menos un "gen informador" tal como cualquier línea celular que incluye constructos de ácido nucleico, ya sea integradas en su genoma, o como elementos de replicación autónoma, que producen una señal tras la activación por el activador, por ejemplo, por activación de genes informadores como luciferasa de luciérnaga o proteína verde fluorescente (GFP).

65

El término "gen informador" como se usa en este documento se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende los siguientes elementos: (1) un sitio de unión para un factor de transcripción artificial, (2) una secuencia promotora mínima (secuencia de caja TATA) (3) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para luciferasa de luciérnaga o GFP (4) una cola de poliA para la terminación de la transcripción.

Revisión

La presente invención se refiere a un nuevo enfoque de doble híbrido basado en ubiquitina dividida que puede servir como una solución muy necesaria en el campo de la proteómica y el descubrimiento de fármacos para abordar el difícil desafío de estudiar las interacciones proteína-proteína (PPI) en células de mamíferos, incluidos los PPI que implican proteínas integrales de membrana integral en diversas condiciones. La metodología novedosa de la presente invención, denominada sistema de dos híbridos de membrana de mamífero (MaMTH), es una mejora inventiva del sistema de doble híbrido de levadura de membrana original (MYTH). Las principales diferencias entre MYTH y MaMTH incluyen: (a) el uso de un fragmento N-terminal de ubiquitina humana (Nub) de tipo salvaje en contraste con la levadura mutante NubG utilizada en MYTH; (b) enlazadores especialmente diseñados añadidos a los vectores MaMTH de cebo y presa para obtener una interacción medible utilizando un conjunto de control positivo de interactores conocidos, y (c) el uso de genes informadores fluorescentes y el informador de luciferasa, que proporciona una lectura sustancialmente diferente que la selección de crecimiento utilizada en MYTH. Si bien el ensayo MYTH proporciona lectura en forma sí/no (ya sea que haya una interacción o no), los métodos de la presente invención también pueden proporcionar un enfoque cuantitativo que permita la medición precisa de la cantidad de PPI, como la fuerza y la afinidad.

MaMTH puede detectar la activación transcripcional de un gen informador tal como luciferasa de luciérnaga o GFP localizada corriente abajo de múltiples sitios de unión a ADN de Gal4 o lexAops. El enlazador de proteína de membrana integral Cub-TF (dominio de unión a ADN GAL4 (DBD) y dominio de activación NFκB (AD) o cebo mLexA-DBD y VP16-AD) y membrana y/o proteína de unión citosólica-Nub-presa pueden ser cotransfectado o infectado con un lentivirus que lleva ADNc que codifica estas dos proteínas en una línea celular de mamífero que expresa de manera estable los genes informadores mencionados anteriormente. Si el cebo y la presa interactúan, puede ocurrir la reconstitución de la ubiquitina, lo que conduce a la escisión proteolítica por las UBP (proteasas específicas de la ubiquitina presentes en la célula huésped) y la posterior liberación del factor de transcripción (TF). El TF puede entonces ingresar al núcleo dando como resultado la activación del gen informador.

Como se muestra en la Figura 6(a), los métodos de la presente invención proporcionan la detección de ligeros cambios en el estado de fosforilación de ErbB WT y mutantes oncogénicos, medidos por el reclutamiento de la proteína adaptadora Shc1. La Figura 6(d) muestra que la interacción entre EGFR-L858R y Shc1 puede inhibirse de manera dependiente de la dosis mediante el tratamiento con el inhibidor de tirosina-quinasa erlotinib. La Figura 9(b) ilustra el efecto aditivo de la mutación doble versus única en el reclutamiento de Grb2 para EGFR.

Aplicaciones

(1) PPI MaMTH puede usarse como una tecnología de criba de alto rendimiento para la identificación de PPI de proteínas de membrana integral humana.

Además de generar el conjunto básico de reactivos de cebo/presa/informador, MaMTH es lo suficientemente sensible como para detectar cambios sutiles en las interacciones de proteínas, que pueden diferir ligeramente dependiendo de la presencia o ausencia de diversos estímulos, como hormonas o agonistas, o drogas inhibitorias. Por ejemplo, MaMTH puede detectar el estado de fosforilación de receptores ErbB oncogénicos a través de la medición directa del reclutamiento de proteínas adaptadoras.

(2) Plataforma de criba de fármacos

Se puede usar MaMTH para controlar las interacciones de inhibidores o potenciadores con proteínas de membrana integral de mamífero. Como tal, MaMTH puede usarse como una plataforma de criba de fármacos adecuada para la identificación de inhibidores o potenciadores de moléculas pequeñas que alteran un conjunto definido de interacciones de proteínas de membrana en su entorno natural. MaMTH puede, por ejemplo, usarse para controlar las interacciones inhibidas por el fármaco (Erlotinib) de los receptores EGFR mutados, tales como la eliminación EGFR-L858R y EGFR-exón19, así como el aumento de la unión de la proteína adaptadora en el EGFR mutante resistente a Erlotinib L858R/T790M15.

Mediante el uso de MaMTH como herramienta de criba, se han detectado 61 interactores previamente desconocidos tanto de tipo salvaje EGFR como de la versión oncogénica EGFR-L858R, este último se encuentra principalmente en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM) [15] y destacar que MaMTH permite el establecimiento de patrones de interacción dinámica de un receptor humano dado. MaMTH es un ensayo genético, que se puede aplicar para probar interactores de cualquier proteína de membrana en diversas condiciones. Además, la expresión estable de todos los componentes de MaMTH, como cebo/presa/informador, a través de la integración

lentiviral puede permitir el uso del sistema en prácticamente cualquier línea celular, y disminuye los artefactos de sobreexpresión debido a la integración de baja copia.

Como tal, la presente invención proporciona un método para estudiar o detectar interacciones en un entorno de células de mamífero entre una primera proteína (membrana o soluble) y una segunda proteína (membrana o soluble). En una realización, el método puede incluir: (a) proporcionar una célula de mamífero huésped que incluye al menos un gen detectable (gen informador (luciferasa de luciérnaga, GFP, etc.)) que tiene un sitio de unión para un factor de transcripción, tal que el gen detectable expresa un producto detectable cuando el gen detectable se activa transcripcionalmente; (b) expresar en la célula de mamífero huésped la primera proteína o parte de la misma, uniéndose la primera proteína o parte de la misma a través de un primer enlazador adecuado a un subdominio C-terminal de una ubiquitina humana (Cub) y el factor de transcripción; (c) expresar en la célula de mamífero huésped la segunda proteína o parte de la misma, estando unida la segunda proteína o parte de la misma a un subdominio N-terminal de la proteína ubiquitina humana (Nub) a través de un segundo enlazador adecuado; y (d) determinar si se detecta el producto detectable, la detección del producto detectable es indicativo de que la primera proteína y la segunda proteína interactúan.

La interacción entre la primera y segunda proteínas expresadas y/o sus partes puede conducir a una interacción del Nub y el Cub, interacción que a su vez conduce a la activación de una proteasa intracelular y a la separación proteolítica del factor de transcripción, en donde ambos el vector de cebo y el vector de presa son adecuados para mantenerse episómicamente o integrarse en el genoma.

En otra realización, la presente invención proporciona un kit de reactivos para detectar la unión entre una primera proteína (unida a la membrana o soluble) o parte de la misma y una segunda proteína o parte de la misma (unida a la membrana o soluble). El kit, en una realización, puede incluir: (a) una célula huésped que contiene al menos un gen informador (luciferasa de luciérnaga o GFP, etc.) que tiene un sitio de unión para un factor de transcripción, de modo que el gen detectable expresa un producto detectable cuando el gen detectable se activa transcripcionalmente; (b) un primer vector (cebo), que puede mantenerse episómicamente o integrarse en el genoma de la célula de mamífero huésped, que comprende un primer sitio para recibir un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína de membrana o parte de la misma de manera que cuando se inserta ácido nucleico, se une a la secuencia de ADN de un primer módulo que codifica, entre otros, un subdominio C-terminal de una proteína ubiquitina humana (Cub) y un primer enlazador adecuado entre la primera proteína de membrana y el Cub, el primer módulo que comprende además un ácido nucleico para un factor de transcripción y un promotor; (c) un segundo vector (presa), que puede mantenerse episómicamente o integrarse en el genoma de la célula huésped, que comprende un segundo sitio para recibir un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína de membrana o una proteína soluble o parte de la misma de manera que cuando se inserta el segundo ácido nucleico, se une a la secuencia de ADN de un segundo módulo que codifica, entre otros, un subdominio N-terminal de la proteína ubiquitina humana (Nub) y un segundo enlazador adecuado entre la segunda proteína de membrana y el Nub, en donde el segundo módulo comprende además un promotor. En un aspecto, el kit incluye además (d) una biblioteca de plásmidos que codifica segundas proteínas o partes de las mismas. En otro aspecto, los cebos que contienen el factor de transcripción comprenden una forma mutada de LexA (mLexA) y VP16 o GAL4-ratónNfκB.

Ventajas

El sistema de la presente invención presenta varias ventajas sobre las técnicas existentes para estudiar las interacciones de las proteínas de membrana, incluido el MyTh: (i) MaMTH puede llevarse a cabo en prácticamente cualquier línea celular debido a la disponibilidad de vectores de presa/cebo/informador para generación de lentivirus, que presenta la ventaja de la integración de copia única y disminuye los artefactos de sobreexpresión. Además, MaMTH se lleva a cabo en células vivas, evitando así los cambios de señal derivados de la lisis celular o la purificación de proteínas utilizadas en los métodos bioquímicos de PPI; (ii) MaMTH es compatible con la técnica de clonación recombinante de Gateway, lo que permite un procedimiento de clonación rápido y fácil en todas las cadenas principales de vectores; (iii) MaMTH puede detectar cambios sutiles en los patrones de interacción, que pueden ser inducidos/reprimidos por fármacos, diversos estímulos o eventos de fosforilación, de una manera altamente específica; (iv) la sensibilidad y flexibilidad de MaMTH lo hace apto para la ampliación a formatos de alto rendimiento; (v) MaMTH puede usarse como una plataforma para el descubrimiento de fármacos, específicamente usada para cribar compuestos novedosos capaces de inhibir la señalización mediada por receptores oncogénicos; (vi) a diferencia del ensayo MYTH, MaMTH puede usarse en estudios cuantitativos para medir la fuerza o afinidad de PPI.

Para ayudar en la comprensión y preparación de la presente invención, se proporcionan los siguientes ejemplos ilustrativos, no limitativos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Construido de cebo, presa y de plásmidos informadores

La tabla 5 muestra una lista completa de esqueletos de plásmidos utilizados en este estudio. La Tabla 6 muestra los cebadores utilizados para generar informadores, cebos y presas.

- 5 Clones de entrada compatibles con Gateway: los clones de entrada se obtuvieron mediante la biblioteca ORFeome humana v8.1⁴⁹ o se amplificaron por PCR a partir de clones de Mammalian Gene Collection para crear clones de entrada en pDONR223 usando la tecnología de clonación Gateway BP (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los clones de entrada se verificaron en secuencia.
- 10 Vectores informadores de dos híbridos de membrana de mamífero (MaMTH): se construyeron constructos informadores lentivirales usando pLD-Gateway-Puro-NVF (obsequio amable de Kim Blakely y Jason Moffat) como esqueleto, que se cortó con BstBI y KpnI para eliminar el marcador de puromicina. El casete marcador de resistencia a cPPT-hPGK-Higro (amplificado de pLD-higro-EcMV, obsequio de Kim Blakely and Jason Moffat) se amplificó por PCR con sitios BstBI/KpnI flanqueantes y se ligó al vector de corte. El vector resultante se cortó con SanDI y Sall y el
- 15 inserto 5xGAL4UAS-TATA-caja-luciferasa (amplificado por PCR a partir de la plantilla pFR-Luc, Stratagene) se ligó al vector. El plásmido 5xGAL4UAS-TATA-caja-luciferasa-higromicina resultante se cortó con SanDI y BamHI para reemplazar los sitios 5xGAL4UAS con sitios 8xlexAops (amplificado por PCR a partir del plásmido L8-Luc⁵⁰). Luego se utilizaron plásmidos 5xGAL4UAS-TATA-caja-luciferasa-higromicinaR y 8xlexAops-TATA-caja-luciferasa-higromicinaR para escindir la luciferasa y clonar eGFP en sitios BamHI/Sall (eGFP se amplificó a partir de la plantilla pLJM1). Los constructos finales se verificaron en secuencia.

- Vectores de destino de cebo y presa MaMTH: se generaron vectores de destino de cebo y presa usando digesto de restricción estándar y protocolos de ligazón T4. Las combinaciones de insertos de factor de transcripción Cub se generaron por recombinación homóloga en levadura: en resumen, las regiones de Cub, el dominio de unión al ADN
- 25 y el dominio de activación transcripcional se amplificaron por PCR (para las plantillas, ver más abajo) con pendientes complementarios al esqueleto del vector de levadura pCCW-Ste o los insertos adyacentes. El pCCW-Ste se cortó con NotI/FspI y se transformaron conjuntamente hasta 3 insertos (Cub, DBD, AD) en levadura BY4742 usando la transformación estándar de acetato de litio⁵¹. Los constructos recombinados se secuenciaron luego y los insertos "Cub-TF" se amplificaron por PCR que contenía 1) regiones de unión y 2) sitios de restricción adecuados para clonar las etiquetas en esqueletos de vectores de mamíferos para generar vectores de destino final. Los vectores de destino finales del cebo se basan en pGateway-CMV5'-tripleFLAG o pGateway-CMV3'-tripleFLAG (obsequios amables del laboratorio de Jason Moffat) y las etiquetas "enlazador-Cub-mLexA-VP16" o "enlazador-Cub-GAL4-mNFKB" se clonaron en sitios XbaI de pGateway-CMV5'-tripleFLAG para obtener vectores de destino de cebo MaMTH para marcado C-terminal. Los vectores de destino de presa final también se basan en pGateway-CMV5'-tripleFLAG o pGateway-CMV3'-tripleFLAG, y el enlazador-tripleFLAG-Nub se clonó en el sitio XbaI de pGateway-CMV5'-tripleFLAG para obtener vectores de presa MaMTH para el etiquetado C-terminal o el enlazador Kozak-Nub-tripleFLAG se clonó en sitios KpnI/HindIII de pGateway-CMV3'-tripleFLAG para obtener vectores de presa MaMTH para el marcado N-terminal. Los esqueletos de presas lentivirales se basaron en pLD-Gateway-Puro-CVF y pLD-Gateway-Puro-NVF (amables obsequios de Kim Blakely and Jason Moffat), y enlazador-tripleFLAG-Nub se clonó en los sitios EcoRV/BstBI de pLD-Gateway-Puro-CVF para obtener vectores de destino de presas lentivirales MaMTH para marcado C-terminal o el enlazador Kozak-Nub-tripleFLAG se clonó en sitios EcoRV/NheI de pLD-Gateway-Puro-NVF para obtener vectores de destino de presas lentivirales MaMTH para marcado de terminales N.

- Se introdujeron regiones enlazadoras de presas incorporando enlazadores en cebadores. La ubiquitina C-terminal (aa 35-76) y la ubiquitina N-terminal (aa 1-37) se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de levadura (para yCub y yNubi) o de ADNc de ubiquitina humana (para hCub y hNubi). Las regiones posteriores a yCub o hCub se amplificaron de MYTH-TMBValpha y contienen un 5'-ATG (ATGcagatcagcttgccgccgc) para garantizar que el factor de transcripción escindido no se degrade de acuerdo con la regla del extremo N (REF). Se generaron variantes de yNubi o hNubi usando protocolos de mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene).

- 50 Todos los vectores de destino de cebo y presa MaMTH se secuenciaron completamente y los clones de expresión (después de la reacción LR de los clones de entrada con los vectores de destino respectivos) se secuenciaron en las uniones entre etiquetas de cebo o presa y ADNc. Los vectores de expresión de cebo y presa se crean usando la tecnología de clonación Invitrogen LR usando los clones de entrada mencionados anteriormente y los vectores de destino de diseño propio.

- Vectores MaMTH para evaluar el rendimiento: los factores de transcripción quiméricos utilizados en la Figura 2 (a) se amplificaron por PCR a partir de ADNc de RELA de ratón (mNFKB), ADNc de RELA humano (hNFKB), GAL4-DBD (pDEST32 Invitrogen), MYTH-vectores pTMBValpha (LexA y VP16) y pNIA E432 #40 (mLexA³¹) y se realizaron
- 60 digestos de restricción estándar y ligazón de T4. Los factores de transcripción quiméricos se ligaron en pGateway-CMV3'-tripleFLAG cortado con KpnI y XbaI, donde se sacó el casete Gateway. Los mutantes de los miembros de la familia ErbB y β 2-AR se generaron mediante mutagénesis dirigida al sitio y se verificaron completamente en la secuencia. Los constructos de GFP para la localización del cebo se construyeron mediante recombinación homóloga en levadura (insertos finales Cub-GFP-mLexAVP16 o Cub-GFP-GAL4-NFKB) y luego se amplificaron por PCR con
- 65 sitios de restricción XbaI y se ligaron en corte pGateway-CMV5'-tripleFLAG con XbaI para generar vectores de destino de cebo-GFP con etiqueta C-terminal.

Generación de lentivirus

El plásmido informador o presa lentiviral se cotransfectó con psPAX2 y pMD2 en células HEK293T usando el reactivo de transfección X-tremeGene9 (Roche) y el medio Optimem-suero reducido (Gibco) 18 horas después de la transfección, los medios se retiraron y se reemplazaron por medios para recolección viral (DMEM+1.1g/100 mL BSA). Después de 24 horas, se realizó la primera recolección viral y se agregaron medios de recolección de alto BSA a las células. Nuevamente después de 24 h, se realizó la segunda recolección y se combinó con la primera recolección y el virus se almacenó a -80°C. El trabajo lentiviral se realizó de acuerdo con todos los requisitos de Bioseguridad.

Generación estable de línea celular

Se analizaron los títulos lentivirales y las células diana se infectaron en una multiplicidad de infección entre 0.3-0.5. 24 h después de la infección, las células se seleccionaron con puomicina (2 µg/ml para HEK293T, 1.5 µg/ml para HCC827, H226, H3255) en caso de infección con presas, constructos de sobreexpresión o ARNsh durante al menos 48 h y se expandieron o congelaron durante más ensayos. En caso de infección con constructos informadores, las células se seleccionaron con higromicina (100 µg/ml para HEK293T) durante al menos 7-10 días, y las células individuales se aislaron por dilución limitada. En resumen, se sembraron células informadoras estables en placas de 96 pozos que, en promedio, cada pozo contiene 1 célula. Aproximadamente 7 días después, las colonias se expandieron y se analizaron para la activación del gen informador. Los clones que dieron una señal de luciferasa alta tras la transfección con factores de transcripción de longitud completa en comparación con los controles negativos se expandieron y se usaron para experimentos adicionales. Se generaron líneas celulares dobles estables de cebo doble/informador a través de la transfección, ya que los constructos lentivirales de cebo excedieron el límite de empaquetamiento lentiviral y dieron un título de virus bajo. Los cebos MaMTH se cotransfectaron con un marcador lineal (Clontech) en una proporción de 20:1 y se seleccionaron en puomicina (2 µg/ml) 48 h después de la transfección durante aproximadamente 7 días. Se aislaron colonias individuales usando cilindros estériles y se analizó la expresión de cebo mediante Inmunoprecipitación Western.

Cultivo de células

Se cultivaron células HEK293T en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal al 10% y antibióticos al 1% (penicilina/estreptomicina). Las líneas celulares de cáncer de pulmón HCC827, H3255 y H226 se mantuvieron en RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos. Las condiciones de inanición se realizaron en DMEM o RPMI sin FBS o con 0.1% de FBS. Se añadió erlotinib (amable donación del Dr. Ming Tsao) a las concentraciones indicadas y se añadió el agonista isoproterenol (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 µM.

Experimentos de transfección

Se realizaron experimentos de transfección usando un método modificado de fosfato de calcio. En resumen, para una placa de 12 pozos, se añadieron 65 µl de ddH₂O y 75 µl de 2xBES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico) al ADN y luego se añadieron 7.5 µl de CaCl₂ 2.5 M y los tubos se agitaron en vórtex y se incubaron a temperatura ambiente y fueron añadidos gota a gota a las células. 8-16 h después, la mezcla de transfección se retiró y se reemplazó con medio.

Ensayo de informador de luciferasa

La actividad de luciferasa de luciérnaga se midió de la siguiente manera: las células informadoras infectadas o transfectadas se sometieron a lisis entre 20 h (para tratamientos con fármacos) o 48 h después de la transfección (análisis de expresión) o 4 días después de la infección. Los pozos se lavaron con PBS y se añadió regulador de lisis informador Promega (1x) más inhibidor de proteasa (Complete-EDTA-Roche). Las placas se congelaron a -80°C para asegurar una lisis completa. La actividad de luciferasa se midió al menos a partir de tres experimentos independientes. Los lisados celulares se midieron luego en un luminómetro inyectable Berthold adecuado para placas de 96 pozos.

Criba MaMTH EGFR interactor

Se clonaron 206 interactores EGFR predichos superiores en esqueletos de presas lentivirales. Después de la recolección de lentivirus, se infectaron células diana (células estables 5xGAL4UAS-luciferasa informador-HEK293T) con una multiplicidad de infección (MOI) de alrededor de 0.3-0.4 para garantizar la integración de una sola copia por célula. Las células se seleccionaron en puomicina durante al menos 48 h y se transfectaron con cebos EGFR-tipo salvaje o EGFR-L858R por triplicado. 24 h después de la transfección, las células se sometieron a lisis y se realizaron ensayos de luciferasa. En cada conjunto de ensayos de interacción, se incluyeron diversos controles negativos. Para calcular los puntajes de interacción MaMTH, se promediaron los controles negativos y se calculó el cambio de multiplicidad de la actividad de luciferasa en comparación con los controles promediados y se definió como el puntaje de interacción.

Por lo tanto, los valores de puntuación de interacción por encima de 1 pueden considerarse como interactores.

Puntuación de interacción MaMTH

Cada conjunto de experimentos contiene un conjunto definido de controles negativos en al menos tres réplicas. Los controles negativos se eligieron de tal manera que exista una gama de controles que muestren una actividad de luciferasa de alto fondo (normalmente proteínas citosólicas: Fabp5, Pex19) así como actividad de luciferasa de medio fondo (interactores unidos a la membrana: Pex7, GABBR2). Se promediaron los controles negativos y se calculó el cambio de multiplicidad de la actividad de luciferasa. Con este método, se tiene un límite estricto y se elige una puntuación de interacción >1 para ser proteínas interactoras.

Anticuerpos y análisis de Inmunoprecipitación Western

El análisis de Inmunoprecipitación Western se realizó usando protocolos estándar. En resumen, las células se recolectaron directamente en 2x regulador de muestra o se recolectaron en 1x regulador de lisis informador (Promega) que contenía inhibidores de proteasa (Complete-EDTA, Roche) y se añadió 2x regulador de muestra después de congelar las células a -80°C. Para los anticuerpos fosfoespecíficos, las células se sometieron a lisis en regulador Ripa que contenía ortovanadato de Na, PMSF e inhibidor de proteasa y se añadieron 2xSB y las muestras se llevaron a ebullición inmediatamente a 95°C durante 5 minutos y se procedió al análisis de Inmunoprecipitación Western. 5-10% de los lisados se separaron por geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las muestras transferidas se inmunoprecipitaron con anticuerpos primarios, seguido de incubación con anticuerpos secundarios acoplados a HRP, y la detección se realizó usando luminiscencia mejorada GE-Healthcare. Puede encontrarse una lista de anticuerpos utilizados en la Tabla 7.

Ensayo LUMIER

Se transfectaron células HEK293T en placas de 96 pozos con constructos de fusión EGFR-Renilla o EGFR-L858R-Renilla junto con 60 plásmidos de cebo etiquetados con 3xFlag seleccionados. Un día después de la transfección, el medio de crecimiento normal (DMEM+FBS al 10%) se reemplazó por medio bajo en suero (DMEM+FBS al 0.1%) durante 16 h. Las células se trataron con EGF 100 ng/ml o se dejaron sin tratar durante 15 minutos antes de la lisis celular. El ensayo LUMIER se realizó como se describió anteriormente, excepto que las interacciones no se normalizaron con la abundancia de proteínas del cebo. LUMIER se realizó por duplicado en tres rondas independientes. Los interactores significativos se basaron en valores p después de los cálculos de la prueba t en comparación con los antecedentes correspondientes.

Microscopía de fluorescencia

Los constructos de cebo (que albergan Cub-GFP-mLexA-VP16) se transfectaron en células 8xlexAops-luciferasa estables sembradas en portaobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina. 48 h después de la transfección, se realizó una microscopía de fluorescencia en un Leica DMI 6000 B usando canales GFP y RFP. Las células se lavaron con PBS tibio y se cubrieron con 5 µg/ml de tinte Invitrogen CellMask Deep Purple durante 5 minutos a 37°C. Las células se lavaron 3 veces con PBS tibio y se usaron inmediatamente para microscopía. Las células se examinaron con un aumento de 63X usando un microscopio Leica DMI 6000 B con GFP, Texas Red y filtros de contraste de interferencia diferencial. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software Volocity.

Resultados

Desarrollo de MatMTH

El MaMTH de la presente invención es una mejora de PCA (ensayo de complementación de fragmentos de proteínas)¹⁶. En resumen, una proteína de "cebo" de membrana está marcada con la mitad C-terminal de la ubiquitina humana (Cub), un enlazador y un factor de transcripción quimérico (TF), y la presa, que puede ser citosólica o unida a la membrana, está acoplada a la mitad N-terminal de la ubiquitina humana (Nub) a través de un enlazador. Solo después de la interacción del cebo y la presa, las mitades divididas forman ubiquitina funcional, que luego es reconocida por las enzimas de ubiquitinación citosólicas (DUB), lo que resulta en la escisión del factor de transcripción y la posterior expresión del gen informador (luciferasa o GFP, Figura 1a). Se tuvo que realizar una mejora inventiva sustancial e ingeniería de proteínas para transferir el MYTH de levadura original a las células de mamífero (Figura 2a-e). Primero, las líneas celulares indicadoras HEK293T estables (que tienen sitios de unión 8xLexA integrados o sitios de unión 5xGal4) se generaron por infección lentiviral, y los clones se analizaron para detectar GFP o expresión de luciferasa. Factores de transcripción adecuados (TF)¹⁸⁻²⁶ usando el dominio de unión al ADN de LexA (DBD) o GAL4-DBD y probó varias combinaciones para la activación del gen informador en las líneas celulares estables 8xlexAops-luciferasa y 5xGAL4UAS-luciferasa. Los factores de transcripción que consisten en dominios de activación (AD) GAL4 (1-147)-DBD y mNFkB (364-550) y mLexA (LexA modificado 1-202)-DBD y VP16 (413-490)-AD se incorporaron los constructos de cebo final ya que mostraron la mayor inducción de luciferasa tras la transfección en células informadoras (Figura 2a). Los controles negativos (ya sea dominio DBD o dominio AD solo)

también se transfectaron para descartar la activación espontánea del gen informador sin factor de transcripción de longitud completa (datos no mostrados). Cada proteína de "cebo" utilizada en este estudio se probó con ambas configuraciones de TF y muestra resultados comparables con ambas. Además, se probaron diversas regiones enlazadoras (ya sea utilizadas en otros PCA o MYTH^{7, 13, 16}) entre los ADNc de cebo/presa y las porciones de ubiquitina (Cub o Nub). Inesperadamente, se descubrió que los enlazadores influían en la reconstitución de las mitades divididas (según lo probado para la reconstitución de la interacción conocida entre ErbB4 y Grb2). Como se muestra en la Figura 2d, las bisagras de glicina-serina flexibles (GGGGS)₂ o (GGGGS)₃ dieron una señal de luciferasa alta, lo que sugiere que puede ser necesaria una cierta flexibilidad estérica para la reconstitución óptima de la pseudoubiquitina. La bisagra flexible de glicina-serina (GGGGS)₂ se eligió para las configuraciones finales de cebo y presa, ya que este enlazador mostró la señal de luciferasa más alta tras la cotransfección de ErbB4 y Grb2 en células informadoras de luciferasa estables (Figura 2d). Debe entenderse que (GGGS)_n, donde "n" es un número entero igual o mayor que 1, también puede usarse.

MYTH utiliza Nubl²⁷ o NubG (Ile13Gly) en constructos de presas, que es una mutación rigurosa que causa menos afinidad de Cub a Nub^{12, 28}. Curiosamente, como se ilustra en la Figura 2e, en MaMTH, NubG no conduce a luciferasa significativa actividad después de la cotransfección de ErbB4-cebo/Grb2-presa, lo que sugiere que NubG es demasiado estricto para ser utilizado en células de mamíferos, lo que podría deberse a diferentes especificidades y abundancia de DUB en levaduras y humanos^{29, 30}. Por lo tanto, variantes menos estrictas de Nub como NubA y NubV, así como la versión de tipo salvaje Nubl se incorporaron a la presa Grb2 y se probaron contra el cebo ErbB4. NubG tiene menos afinidad por Cub, seguido de NubA y NubV, y Nubl es la versión de tipo salvaje.

Las diversas versiones de Nub se incluyeron en las presas Grb2. El cebo y la presa se cotransfectaron en líneas celulares estables con 5xGAL4UAS-luciferasa y 48 horas después, se midió la actividad de luciferasa. Las relaciones de luciferasa se calcularon en base al cambio de multiplicidad de la actividad de luciferasa sobre los controles negativos promediados.

Como se muestra en la Figura 2e, las versiones de levadura y humana de ubiquitina son reconocidas por las UBP en células humanas, aunque Nub y Cub humanos muestran una señal de luciferasa aproximadamente un 15% más alta. Las presas Grb2 que contienen Nubl o NubV muestran una señal de interacción alta después de la cotransfección con cebo ErbB4, mientras que NubA y NubG muestran una señal baja en MaMTH.

NubV y Nubl dieron las señales de interacción ErbB4-Grb2 más altas, y posteriormente Nubl fue elegido para ser incorporado en vectores de presa (Figura 2e). Además, aunque la ubiquitina de levadura y humana solo difiere en 3 aminoácidos, ambas variantes se incorporaron al cebo ErbB4 y a la presa Grb2. Humano NubX y Cub mostraron una mayor afinidad entre sí en comparación con las variantes de levadura, lo que resulta en una mayor actividad de luciferasa de la interacción ErbB4-Grb2 (Figura 2e). Por lo tanto, las versiones humanas de Cub y Nub se incluyeron en los vectores finales de cebo y presa.

Finalmente, en contraste con MYTH, que usa LexA-VP16 en todos los constructos de cebo, se incorporó una forma mutada de LexA (mLexA³¹) en los constructos de cebo, que elimina una secuencia de señal similar a NLS y por lo tanto muestra menos activación de fondo cuando el cebo solo se transfecta en células indicadoras (Figura 2f). Como se muestra en la Figura 2f, la transfección del cebo ErbB4-LexA-VP16 solo en células estables 8xlexAops-luciferasa dio como resultado una actividad de luciferasa de fondo, lo que sugiere que parte de los cebos se transfiere al núcleo a través de la supuesta secuencia NLS. El uso de cebo ErbB4-mLexA-VP16 disminuyó la autoactivación y, por lo tanto, se eligió para ser incluido en los constructos finales de cebo. Como control positivo, el interactor conocido Grb2 se cotransfectó con ErbB4, lo que demuestra que la mutación de LexA a mLexA solo tiene efectos menores en el ensayo de interacción.

La figura 2g muestra la configuración final de constructos de cebo, presa y informador usadas para MaMTH. Los cebos MaMTH están normalmente etiquetados con C, mientras que existen ambas versiones de presas (N-etiquetados y C-etiquetados). Todos los constructos de cebo y presa son compatibles con Gateway, lo que permite una clonación fácil y contienen un enlazador (GGGGS)₂. Los cebos se pueden usar tanto en la configuración GAL4-NFκB como en la configuración mLexA-VP16, que debe determinarse caso por caso. Las células informadoras HEK293T expresan de forma estable 5xGAL4UAS-luciferasa/GFP o 8xlexAops-luciferasa/GFP.

Rendimiento y validación de MaMTH

La inducción de la expresión del gen informador se evaluó tanto para los indicadores estables de GFP como de luciferasa (tanto en configuraciones 5xGAL4-UAS como 8xlexAops). Las líneas celulares dobles indicadoras de ErbB4 estables se infectaron con Shc1 o Grb2 (controles positivos) o Fabp5 (control negativo) o no se infectaron (para probar la autoactivación del cebo) y se evaluaron tanto la actividad de GFP como la luciferasa (Figura 1b, Figura 3). Se ha demostrado que MaMTH es altamente específico y puede detectar interacciones ErbB4-Grb2/Shc1 en todas las configuraciones probadas. La activación del gen informador se correlaciona con el factor de transcripción escindido, que se monitorizó por Inmunoprecipitación Western. Los cebos que albergan el factor de transcripción GAL4-NFκB muestran una mayor actividad de fluorescencia y luciferasa, pero muestran un poco más de fondo con el control negativo (Figura 1b, Figura 3). La Figura 1b ilustra que la interacción conocida entre ErbB4 y

Grb2 o Shc1 se puede detectar en ambas configuraciones de factores de transcripción, mientras que el control negativo (Fabp5) y el cebo solo están cerca del fondo. La activación del gen informador debido a los TF escindidos también puede ser seguida por Inmunoprecipitación Western usando el anticuerpo VP16 (para cebos con mLexA-VP16-TF) o el anticuerpo V5 (para cebos con GAL4-NfκB-TF). En general, tanto los informadores de GFP como de luciferasa pueden usarse en MaMTH, pero los cambios sutiles en las interacciones pueden definirse mejor usando la actividad de luciferasa que GFP y, por lo tanto, todos los experimentos adicionales se realizaron usando informadores de luciferasa

Para evaluar adicionalmente la especificidad de MaMTH, se probaron diversas proteínas de membrana contra sus interactores de proteínas conocidos y controles negativos (proteínas que no interactúan) usando ambas configuraciones de cebo TF (Figura 1d, Figura 5). La figura 1c muestra una representación de la localización correcta de la membrana plasmática de cebos ErbB que fueron marcados con Cub-GFP-mLexA-VP16 para descartar que la etiqueta MaMTH tenga influencia en la localización y, por lo tanto, en la función. Las etiquetas de cebo son relativamente grandes, entre 1000-1200 pb, por lo tanto, la localización del cebo se analizó para los receptores ErbB que contienen Cub-GFP-mLexA-VP16 para probar si la etiqueta MaMTH influye en la localización del cebo y, por lo tanto, funciona. Los cebos que albergan GFP se transfectoron en células indicadoras sembradas en placas de vidrio recubiertas con poli-L-lisina y 36 h después de la transfección, las células se tiñeron con una mancha de membrana plasmática (Deep Red, CellMask) y se realizó una microscopía de fluorescencia. A continuación, se infectaron las líneas celulares de doble informador EGFR-5xGAL4UAS o doble informador ErbB4-5xGAL4UAS con las presas indicadas y se realizaron ensayos de luciferasa (Figura 1d, Figura 5c). Las líneas celulares HEK293T del informador cebo/luciferasa-5xGAL4UAS-luciferasa doblemente estables se infectaron con presas indicadas a una MOI (multiplicidad de infección) de 0.4. 4 días después de la infección, las células se sometieron a lisis y se sometieron a ensayos de luciferasa. Como se ilustra en la Figura 1d, las interacciones conocidas entre EGFR (gráfico inferior de la Figura 1d) o ErbB4 (gráfico superior de la Figura 1d) con Grb2, Shc1 y Hsp90 podrían verificarse usando MaMTH y proporcionaron altas señales de luciferasa en comparación con los controles negativos. Además, EGFR muestra interacción con su asociado conocido GAPDH. Los controles positivos como Grb2, Shc1 y Hsp90 se detectan bien por encima del fondo, mientras que los controles negativos fueron significativamente más bajos o comparables al control de solo cebo. Otras interacciones conocidas, como la heterodimerización entre el receptor acoplado a la proteína G GABBR1-GABBR2 o las interacciones TGF-beta del receptor TGFβR1-FKBP12 también se reconstituyeron con acierto, entre otras (Figura 5b-e). Debe notarse que tanto la cotransfección de cebo/presa como la infección de cebo/presa dan resultados de interacción comparables en ambas configuraciones de TF (Figura 5b-e).

MaMTH puede detectar interacciones inducidas por agonistas o ligandos, inhibidas por fármacos y dependientes de fosfo

Monitorización de la interacción inducida por el agonista entre β2-AP y β-arrestina

Para probar más a fondo si MaMTH puede detectar interacciones inducibles, se reconstituyeron las interacciones proteína-proteína (PPI) conocidas entre el receptor adrenérgico β2 humano (β2-AR), un receptor acoplado a proteína G y β-arrestina³². La última proteína se asociará con β2-AP solo si un agonista como el isoproterenol se une al receptor, lo que conduce a la señalización posterior de la proteína G, la fosforilación de GRK y la unión de β-arrestina³². La Figura 4a ilustra la detección eficiente del PPI β2-AR/β-arrestina dependiente de agonista usando MaMTH.

El cebo β2-AR y la presa β-arrestina se cotransfectaron en células indicadoras 8xlexAops-luciferasa estables HEK293T. 24 h después de la transfección, las células se trataron con o sin agonista (10 μM de isoproterenol) en medio de inanición durante 4-12 h. En los puntos de tiempo indicados, las células se recolectaron y se realizaron ensayos de luciferasa. 8 h después de la adición del agonista, un aumento de 2 veces en la expresión de luciferasa indicó niveles elevados de receptor activado, lo que condujo a un aumento en el reclutamiento de β-arrestina. Los lisados celulares se analizaron adicionalmente para determinar los niveles de expresión. Las células se tratan con isoproterenol durante 8 h para controlar mejor la inducción de la unión de β-arrestina. Como se muestra en la Figura 4a, se puede detectar la unión sin agonista, como resultado de la unión residual de β-arrestina a β2-AR. Para probar si esta interacción es específica, mutamos los sitios de fosforilación de GRK en β2-AR. El cebo de tipo salvaje β2-AR y los cebos mutantes que carecen de sitios de fosforilación GRK6-, GRK2 o GRK2+GRK6 y presas de β-arrestina se cotransfectaron en células indicadoras de luciferasa 8xlexAops estables HEK293T. 24 h después de la transfección, las células se trataron con isoproterenol 10 μM durante 8 h. Se sometieron a lisis las células y se realizaron ensayos de luciferasa. Como se muestra en la Figura 4b, los β2-AR que carecen de fosfo-sitios GRK2 mostraron una unión reducida de β-arrestina tras la adición de agonista en comparación con el tipo salvaje, y β2-AR que carecen de fosfo-sitios GRK2 y GRK6 no mostraron una mayor unión a β-arrestina tras la adición de agonista, comparable a las condiciones no tratadas. Con el fin de excluir que la inestabilidad de los mutantes conduzca a una disminución de la unión, se realizó análisis de Inmunoprecipitación Western (Figura 4c) así como microscopía de fluorescencia (Figura 4d). Una fracción de los lisados se sometió a análisis de Inmunoprecipitación Western usando anti-VP16 (para evaluar la expresión del cebo) y anticuerpos anti-tubulina. Como se muestra en la Figura 4c, los mutantes de cebo muestran una expresión comparable con y sin agonista, lo que sugiere que la reducción de la interacción con mutantes de cebo se debe realmente a un menor reclutamiento de β-arrestina. La Figura 4d son microfotografías

para evaluar si la introducción de mutaciones de fosfo-sitio (GRK2, GRK6 o GRK2/GRK6-sitios) en el constructo del cebo β 2AR influye en la localización del cebo, GFP se clonó en constructos de cebo (Cub-GFP-mLexAVP16) y la colocalización se realizó usando un marcador de membrana plasmática (tinción de membrana plasmática de color rojo oscuro, Invitrogen CellMask). Todos los mutantes probados se expresan por igual y se localizan en la membrana plasmática (Figura 4c y d).

Monitorización de interacciones dependientes de fosforilación de miembros de la familia oncogénica ErbB

Luego, se buscó centrarse más específicamente en la subfamilia ErbB de receptores de tirosina quinasas (RTK) para investigar las interacciones inhibitoras de fármacos y dependientes de ligandos. La familia ErbB consta de 4 receptores estrechamente relacionados: EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4. La elucidación de la señalización celular a través de los cuatro receptores ErbB es de gran interés terapéutico, ya que con frecuencia se encuentran mutados o sobreexpresados en varios tipos de cáncer. Al unirse a los ligandos extracelulares, estos receptores experimentan cambios conformacionales que facilitan su homo o heterodimerización que conduce a la activación de las vías de señalización corriente abajo que regulan la proliferación y supervivencia celular³³. Para monitorizar los PPI dependientes de estímulos de ErbBs con proteínas adaptadoras Shc1 y Grb2, y Hsp90-chaperona (que se reclutan para el receptor activo), se realizó MaMTH en presencia y ausencia de suero. Como se demostró en la figura 7a, MaMTH permite la monitorización de los PPI dependientes de estímulos, reflejados por un aumento en la señal de luciferasa en las células que expresan ErbB2 y Grb2, Shc1 o Hsp90 en presencia de suero en comparación con condiciones de privación de nutrientes, que fue más pronunciada en células que expresaban Grb2, aunque casi no se detectó ningún efecto en las muestras de control (vector vacío o proteína "presa" Pex13 no interactuante). La actividad residual se puede ver en las células privadas de suero, lo que refleja la fosforilación del receptor basal. A continuación, se muestra que el tratamiento con el inhibidor no específico de la tirosina quinasa (TKI-PD158780) puede reducir la fosforilación de ErbB4, lo que resulta en una reducción de la unión a la proteína del adaptador Shc1, siendo una primera indicación de que MaMTH permite la monitorización de los PPI inhibidos por fármacos (Figura 7b).

Además, se buscó probar si las interacciones MaMTH pueden reflejar el estado de fosforilación de un receptor dado a través de la monitorización de la unión de interactores dependientes de fosfo. Muchas versiones de los receptores oncogénicos ErbB son constitutivamente activas, lo que aumenta la señalización corriente abajo implicada en las respuestas celulares proliferativas y antiapoptóticas³⁴. Los mutantes oncogénicos ErbB4 encontrados en pacientes con melanoma³⁵ fueron generados y probados para la unión de Shc1 (Figura 6a, panel izquierdo). Las células indicadoras de luciferasa 5xGAL4UAS-HEK293T estables se cotransfectaron con varios cebos ErbB oncogénicos y se midió la actividad de presa Shc1 y luciferasa 24 h después del crecimiento en ausencia/presencia de suero. Las variantes oncogénicas de ErbB4 se generaron de acuerdo con Prickett T., et al.³⁵ ErbB4-E542k y ErbB4-E872K muestran un reclutamiento de Shc1 independiente del suero, correlacionando con las características oncogénicas del receptor. Se pudo detectar un mayor reclutamiento de Shc1 para los receptores oncogénicos incluso en ausencia de suero en comparación con los receptores de tipo salvaje, lo que indica una señalización independiente de estímulos debido a la fosforilación del receptor constitutivo, correlacionando con su naturaleza oncogénica. En contraste, el mutante ErbB4-R544W muestra la unión de Shc1 comparable al tipo salvaje en condiciones de falta de suero, y se ha demostrado que conduce a una fosforilación del receptor menos pronunciada que los otros mutantes probados³⁵. A continuación, dos de los mutantes oncogénicos EGFR más comunes, EGFR-G719S y EGFR-L858R¹⁵, se analizaron para determinar la unión de Shc1 (Figura 6a, panel derecho). Nuevamente, tanto EGFR-G719S como EGFR-L858R muestran una mayor unión de Shc1 en condiciones independientes del suero en comparación con el tipo salvaje en condiciones de falta de suero, y EGFR-L858R también muestra un aumento en los medios que contienen suero. Investigamos más formas mutadas de EGFR como EGFR-L858R, que, junto con la eliminación EGFR-exón19, representan el 85-90% de todas las mutaciones de EGFR encontradas en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM)^(15, 36, 37) y que muestra actividad quinasa constitutivamente activa independiente de la unión del ligando³⁸. Las células indicadoras de luciferasa 5xGAL4UAS-HEK293T estables se cotransfectaron con cebos muertos EGFR-Wt, EGFR-L858R o EGFR-D855A-quinasa y presa adaptadora Shc1. Las células se cultivaron en presencia/ausencia de suero durante 20 h, se sometieron a lisis y se analizaron para determinar la actividad de luciferasa. Como se muestra en la Figura 6b, EGFR-L858R constitutivamente activo muestra un aumento de la unión de Shc1 tanto en medios que contienen suero como en medios libres de suero, correlacionando con su estado de fosforilación aumentado y, por lo tanto, aumento del reclutamiento de Shc1 en comparación con el tipo salvaje. En contraste, el EGFR-D855A muerto en quinasa no muestra unión a Shc1 en ambas condiciones. Como se ve en la Figura 6b, el receptor EGFR-L858R mutado mostró una asociación significativamente mayor con Shc1 en comparación con el tipo salvaje EGFR (EGFR-Wt) tanto en condiciones sin suero como sin suero, mientras que el EGFR-D855A sin quinasa perdió su capacidad para unir Shc1 por completo. Para excluir que la diferencia en la unión se deba a los niveles variables de proteína del receptor debido a la diferente expresión del receptor, se realizó un análisis de Inmunoprecipitación Western y se muestra que todos los receptores mutantes se expresan igualmente como de tipo salvaje (tanto en condiciones sin suero como sin suero, (Figura 6c, que se muestra solo en estado sérico). También se monitorizó el estado de fosforilación de los diversos receptores mediante transferencia con anticuerpo anti-fosfotirosina y se muestra que mientras que EGFR-D855A tiene una fosforilación muy débil, EGFR-L858R muestra un aumento de la fosforilación en comparación con el salvaje tipo (Figura 6d).

MaMTH puede capturar interacciones inhibidas por erlotinib de variantes oncogénicas de EGFR

A continuación, se buscó utilizar MaMTH para controlar los PPI que son inhibidos por un fármaco de molécula pequeña. Específicamente, utilizamos el inhibidor de tirosina quinasa de molécula pequeña Erlotinib (Tarceva, OSI-774) que previamente se ha informado que inhibe selectivamente la actividad de la quinasa de algunos receptores EGFR mutados pero no de tipo salvaje¹⁵, y por lo tanto evita la unión a componentes de señalización corriente abajo como proteína adaptadora Shc1. Erlotinib está en uso clínico para el tratamiento del cáncer de pulmón y es especialmente efectivo si los pacientes albergan una mutación EGFR-L858R o una eliminación EGFR-exón19del. Las células se cultivaron a las concentraciones de erlotinib indicadas en la Figura 6e y los ensayos de luciferasa se realizaron 20 h después del tratamiento. EGFR-L858R muestra una disminución de la unión de Shc1 a 150 nM, mientras que EGFR-exón19del mutante ya a 10 nM. Esto corresponde con el hecho de que EGFR-exón19del es más sensible al tratamiento con erlotinib que EGFR-L858R. La unión de Shc1 en EGFR-tipo salvaje no está influenciada por erlotinib. La Figura 6e muestra que MaMTH detectó eficientemente la inhibición mediada por Erlotinib de la interacción EGFR-L858R/Shc1 o EGFR-exón19del/Shc1 en comparación con la interacción EGFR-Wt/Shc1. Notablemente, mientras que la unión de EGFR-Wt/Shc1 no se vio afectada en todas las concentraciones de Erlotinib probadas, EGFR-L858R tuvo una caída en la unión de Shc1 a partir de 100 nM, mientras que el mutante EGFR-ex19del mostró una unión disminuida de Shc1 a 5-10 nM (Figura 6e; ver también Figura 8b). Esto se correlaciona con el estudio publicado anteriormente que muestra que EGFR-ex19del es más sensible a Erlotinib que EGFR-L858R40. Los pacientes con cáncer de pulmón tratados con Erlotinib con frecuencia desarrollan una segunda mutación EGFR (L858R/T790M), que hace que el receptor no responda al tratamiento con Erlotinib debido a una afinidad muy elevada por el ATP y, por lo tanto, a una mayor fosforilación del receptor³⁶.

En un siguiente paso, se monitorizó la unión de Shc1 usando proteínas EGFR-Wt, EGFR-L858R, EGFR-ex19del y EGFR-L858R/T790M "cebo". Las células indicadoras 5xGAL4UAS-luciferasa HEK293T estables se cotransfectaron con cebos indicados y Shc1 y se trataron con erlotinib 250 nM o 500 nM durante 20 h, seguido de medición de luciferasa. Como se ve en la Figura 6f, el cebo EGFR-L858R/T790M muestra una unión constante de Shc1 en erlotinib 250/500 nM, correspondiente a su resistencia informada a erlotinib, ya que el receptor todavía está fosforilado independientemente del tratamiento con erlotinib. Es importante destacar que EGFR-L858R/T790M no muestra una disminución de la unión de Shc1 tras el tratamiento con Erlotinib y se comporta como EGFR-Wt, correlacionando con su conocida resistencia a Erlotinib (Figura 6f). Todos los receptores mutantes muestran una mayor unión basal de Shc1 que EGFR-Wt (Figura 6g). Los cebos EGFR-Wt, EGFR-L858R, EGFR-exón19del y EGFR-L858R/T790A se transfectaron en células informadoras 5xGAL4UAS-luciferasa HEK293T estables en medios que contienen suero. 6 h después de la transfección, se añadió Erlotinib a concentraciones de 0, 250 o 500 nM y las células se sometieron a lisis 20 h después del tratamiento y se realizó un análisis de Inmunoprecipitación Western usando anticuerpos anti-EGFR y anti-fosfo-EGFR. Como se ve en la Figura 6h, la unión aumentada de Shc1 se correlaciona con el patrón de fosforilación de los receptores, lo que demuestra que los mutantes EGFR-L858R y EGFR-ex19del son sensibles a Erlotinib, mientras que tanto EGFR-Wt como EGFR-L858R/T790 se fosforilan con el tratamiento con Erlotinib en condiciones dependientes del suero. Tomados en conjunto, estos ejemplos demuestran que MaMTH puede usarse para monitorizar los PPI que dependen de la actividad (estado de fosforilación) de un receptor dado.

Usando MaMTH para mapear fosfo-sitios involucrados en interacciones proteína-proteína

Luego se probó si se podía mapear sitios de fosfo en un receptor ErbB dado responsable de la unión de la proteína adaptadora. Con este fin, generamos un conjunto de mutaciones en tirosinas designadas⁴¹, que se muestran en la Figura 9a. Podríamos volver a confirmar los sitios de unión a Grb2 previamente informados en EGFR (Figura 9b), monitorizando con precisión un efecto aditivo para mutantes dobles versus simples como se muestra para EGFR-Y1092A y EGFR-Y1092A/Y1138A respectivamente. Además, se muestra que ErbB2-Y1139A y ErbB3-Y1262A/Y1199A, que son sitios conocidos de unión a tirosina de fósforo para Grb2, muestran una unión reducida a Grb2 tras la unión de ligando en comparación con el tipo salvaje (Figura 9c). Como Shc1 se une a otras tirosinas fosforiladas en ErbB2, no se pudo observar ningún efecto sobre la unión de Shc1 en el mutante Grb2-fosfo-sitio ErbB2-Y1139A, pero aún se pudo detectar en ErbB3-Y1262A/Y1199A (Figura 9d).

Investigación de patrones de interacción dinámica de EGFR-tipo salvaje y EGFR-L858R en una criba de interacción de proteínas dirigida

Hasta este punto, se demuestra que MaMTH puede detectar interacciones dependientes de fosfatos, inducidas por ligandos o agonistas e inhibidas por fármacos entre diversos receptores y sus interactores. Para ampliar el conocimiento de la señalización de EGFR, luego se buscó aplicar MaMTH para detectar nuevos interactores de EGFR y su variante oncogénica EGFR-L858R. Las mutaciones en EGFR ocurren en muchos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón, lo que hace que este receptor sea un objetivo prometedor para las terapias contra el cáncer. Dado que el cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer en todo el mundo⁴², parece intuitivo que sea muy importante obtener información sobre cómo se regulan los receptores oncogénicos y cómo modulan las vías de señalización corriente abajo a través de las interacciones con diversos asociados.

Por lo tanto, se realizó una criba de interacción dirigida usando 206 interactores EGFR predichos (Tabla 1). En resumen, las líneas celulares estables de luciferasa 5xGAL4UAS se infectaron con 206 presas lentivirales individuales (marcadas con C o N terminalmente, dependiendo de su localización celular) a una baja multiplicidad de infección (MOI=0.4), seleccionadas en puromicina durante 3 días y transfectado con EGFR-tipo salvaje o EGFR-L858R. Cabe señalar que, en este caso, la generación de células HEK293T estables con doble informador/cebo no tuvo acierto, ya que la integración estable de EGFR-L858R en las células indicadoras dio como resultado un aumento de la muerte celular y no dio resultados reproducibles de luciferasa. Se evaluó la expresión de presas lentivirales (datos no mostrados) y la expresión de cebo se probó al azar tanto para EGFR-Wt como para EGFR-L858R. De 206 presas pronosticadas, 144 interactuaron con EGFR-Wt, EGFR-L858R o con ambos (la lista completa de interactores probados se encuentra en la Tabla 2). El límite de 1 se basa en la diferencia de cambio de multiplicidad en la actividad de luciferasa sobre los controles negativos promediados. Los controles negativos incluyen presas citosólicas (que tienden a unirse promiscuamente a muchas proteínas), proteínas de presas de membrana plasmática y peroxisomal. En general, se eligieron condiciones rigurosas probando presas que tienden a tener un alto nivel de luciferasa con cualquier cebo probado, para generar datos de interacción de alta confianza. Los datos de interacción se dividieron en dos conjuntos: presas que se unen más fuerte a EGFR-L858R (86/144 con una relación de puntuación de interacción Wt/L858R <0.9), aquellas que se unen por igual (20/de 144 con una puntuación de interacción Wt/L858R 0.9 -1.1) y aquellos que se unen más fuerte a EGFR-Wt (38/144 con una puntuación de interacción Wt/L858R >1.1). El hecho de que la mayoría de las presas se unan más fuerte al receptor mutante es indicativo del aumento del estado fosfo del receptor mutante y del reclutamiento de interactores dependientes de fosfato. De hecho, 27 de 87 presas que se unen más fuerte al EGFR-L858R contienen un dominio SH2, y 2 de 87 contienen un dominio PTB (Tabla 2). Los residuos de tirosina fosforilados en el receptor son típicamente sitios de acoplamiento para objetivos citoplasmáticos corriente abajo y reconocidos a través de dominios SH2 o PTB⁴³. Esto se puede ver con proteínas adaptadoras como Shc1, CRK y Grb2, que se sabe que se unen más a EGFR-L858R y todas contienen un dominio SH2. La figura 10 muestra una transferencia de puntos resumida de interacciones de EGFR-Wt y EGFR-L858R y anota los interactores en procesos celulares, así como en conjuntos de datos de expresión de cáncer de pulmón. Entre 206 presas probadas, alrededor de 150 alcanzaron el nivel umbral de 1 (puntaje de interacción mencionado anteriormente) en EGFR-tipo salvaje, EGFR-L858R o en ambos cebos probados. La transferencia de puntos muestra la fuerza diferencial de unión, las presas cercanas al eje y son aquellas que interactúan más fuerte con EGFR-L858R y las presas cercanas al eje x muestran una interacción más fuerte con EGFR-tipo salvaje. Las líneas diagonales de color gris claro muestran el área donde las presas se muestran alrededor de una interacción 2 veces mayor con el tipo salvaje o mutante. Las líneas diagonales de color gris oscuro muestran el área donde las presas se muestran alrededor de una interacción 4 veces mayor con el tipo salvaje o mutante. Las presas en las líneas negras diagonales interactúan de manera similar tanto con el tipo salvaje como con el mutante.

Validación de interactores MaMTH utilizando el ensayo ortogonal LUMIER

Como una validación secundaria de nuestros ensayos de criba de MaMTH con EGFR-wt o EGFR-L858R, un subconjunto de PPI seleccionados del conjunto de datos interactor se probó adicionalmente mediante el ensayo ortogonal LUMIER^{5, 6}. Para lograr esto, se etiquetaron 60 FLAGS. Los interactores de MaMTH se cotransfectaron con EGFR-L858R y EGFR-Wt marcados con Renilla y se dejaron sin suero o con privación de nutrientes y se trataron con EGF y posteriormente, se realizó el ensayo LUMIER. De los 60 interactores de MaMTH evaluados, 24 fueron LUMIER-positivos (40%) (Figura 11a, Tabla 3). Los interactores que no fueron capturados podrían ser aquellos que son interactores transitorios o débiles, por lo que podrían no detectarse mediante el método de coinmunoprecipitación (basado en co-IP).

Con referencia a la Figura 11(a), se realizaron bloqueos de shARN de todo el genoma en células HCC827 con y sin Erlotinib, y se midió el enriquecimiento o el agotamiento de las horquillas individuales mediante hibridación de microarreglos. Los genes pueden agotarse en condiciones tratadas con Erlotinib (triángulo descendente) o enriquecerse, lo que conduce a un fenotipo de aptitud disminuido o aumentado.

En general, dado que ambos ensayos son métodos sustancialmente diferentes (un ensayo basado en dos híbridos, el otro método basado en co-IP), esto enfatiza la calidad de las presentes cribas PPM MaMTH.

La anotación funcional de los aciertos de MaMTH revela nuevos roles de interactores EGFR en la sensibilidad/resistencia a Erlotinib

En resumen, se pudo detectar 61 interactores EGFR no descritos previamente (Tabla 2). De 206 interactores predichos bioinformáticamente, un total de 109 son interactores EGFR conocidos. Por lo tanto, MaMTH podría detectar el 76% de los interactores conocidos (87/109), lo que resulta en una tasa de falsos negativos del 24%. Varios interactores podrían haberse perdido debido a diversas razones, como la baja expresión basada en lentivirales de estas "proteínas de presa" o el método de elección para detectar interacciones.

En general, es sorprendente que el receptor EGFR-L858R muestre un patrón de unión aumentado a aproximadamente el 60% de las proteínas "presas" que interactúan. Esto sugiere que el receptor oncogénico debido a su estado constitutivamente activo de hecho se une a más proteínas que son reclutadas por el receptor fosforilado.

Apoyando esta noción, se ha postulado que las proteínas relacionadas con la enfermedad tienen un 32% más de interacciones que sus versiones sin enfermedades, lo que también se correlaciona con nuestros datos⁴⁴. A través del aumento de la unión de estas proteínas, las cascadas de señalización corriente abajo están activas, lo que lleva a una mayor proliferación y otras firmas relacionadas con el cáncer, lo que también se refleja en el hecho de que una gran parte de los interactores detectados (57/86) están involucrados en la señalización transducción (Tabla 4). La figura 10 muestra la comparación con los conjuntos de datos de expresión de cáncer de pulmón. Se encuentran 15 y 38 presas reguladas hacia arriba o hacia abajo en 25 conjuntos de datos de expresión de cáncer de pulmón, lo que señala un papel crucial de estos interactores en la señalización del cáncer. Entre ellos, 13 interactores son, además, un marcador pronóstico para el cáncer de pulmón (Tabla 4). Uno de ellos es CRK, que, junto con CRKL, pertenece a la familia Crk de proteínas adaptadoras y sirve para unir las tirosina quinasas con proteínas efectoras, pero también está implicado en los procesos de señalización. Se ha demostrado que ambas proteínas contribuyen al comportamiento maligno de las células y a menudo se encuentran sobreexpresadas en varios tipos de cáncer⁴⁵. Concomitantemente, se muestra que tanto CRK como CRKL muestran propiedades de unión aumentadas hacia el receptor EGFR-L858R, siendo indicativos de su naturaleza oncogénica.

STUB1 pertenece al grupo de interactores que se unen más fuertemente a EGFR-Wt. Se ha demostrado que STUB1 está implicado en la degradación de ErbB2 en el cáncer de mama, y se ha propuesto que sea una firma pronóstica para la supervivencia del paciente. Como EGFR-L858R se une menos a STUB1, esto podría indicar que el receptor está más estabilizado y menos propenso a la degradación⁴⁶.

Para ampliar la comprensión de cómo estas nuevas presas están involucradas en la señalización de EGFR, comparamos nuestro conjunto de datos MaMTH con experimentos de eliminación de ARNsh realizados en células HCC827 en condiciones no tratadas y tratadas con Erlotinib. En resumen, las células HCC827 se infectaron con un grupo lentiviral de shARN de 80k en una multiplicidad de infección (MOI) de 0.4. Las células se cultivaron sin o con Erlotinib, y con el tiempo, ciertos ARNshs se enriquecieron o agotaron de los grupos dependiendo de si la eliminación del ARNm complementario muestra una ventaja o desventaja de crecimiento para las células. En cada punto de tiempo, el ADN genómico se aísla de un subgrupo de células y los insertos de ARNsh se amplificaron por PCR, luego se digirieron para revelar los códigos de barras de horquilla y luego se hibridaron con microarreglos para determinar la abundancia relativa de cada ARNsh en el grupo. Se comparó la abundancia de shARN de células HCC827 no tratadas y tratadas y se calculó una tasa de abandono relativa, que muestra si la desactivación de genes confiere una desventaja de aptitud (genes agotados) o una ventaja de aptitud (genes enriquecidos) sobre el tratamiento con Erlotinib. Dividimos nuestro conjunto de datos interactor MaMTH en dos subconjuntos: presas que se unen más fuerte a EGFR-L858R y presas que se unen más fuerte a EGFR-tipo salvaje y que también eran LUMIER-positivas. Se comparó la superposición entre interactores y genes que se agotaron (disminución del estado físico) o se enriquecieron (aumento del estado físico) durante la criba de eliminación de ARNsh (los datos de MaMTH/LUMIER se compararon con las tasas de abandono relativo de HCC827 no tratado/tratado con Erlotinib) (Figura 11a). Simplemente tomamos en cuenta las tasas de abandono relativas con un valor $p < 0.1$ y una fdr (tasa de falso descubrimiento) de < 0.4 para tener un conjunto de datos de alta confianza para comparar los interactores identificados. Las presas que se muestran en las cortezas grises entran en la categoría de genes agotados, lo que significa que la eliminación de estos candidatos conduce a una disminución de la aptitud física con Erlotinib en comparación con las células no tratadas. Las presas que se muestran en barras negras caen en la categoría de genes enriquecidos, lo que significa que la eliminación de estos candidatos conduce a una mayor aptitud con Erlotinib en comparación con las células no tratadas (Figura 11b). Como ejemplo, GRAP2, que se une más fuerte al EGFR mutante, muestra un fenotipo de aptitud aumentada de las células HCC827 tras el tratamiento con Erlotinib, lo que indica que esta proteína confiere una mayor sensibilidad a Erlotinib. Interactores conocidos como Shc1 y CRK muestran disminución de la aptitud física en las células HCC827 tratadas con Erlotinib, lo que sugiere que estas proteínas confieren una mayor resistencia a Erlotinib. Esto apunta a funciones importantes de los interactores EGFR en el aumento o la disminución de la sensibilidad a Erlotinib a través de diversos mecanismos reguladores, que pueden involucrar la fosforilación o estabilización del receptor o pueden afectar las vías de señalización corriente abajo. En el futuro, el análisis funcional en profundidad de estos interactores novedosos dará más información sobre cómo 1) los mecanismos de señalización de EGFR y 2) la sensibilidad/resistencia mediada por Erlotinib son monitorizados, por lo que es de suma importancia para la futura definición de objetivo de drogas NSCLC.

Discusión

Las proteínas de membrana desempeñan papeles fundamentales en las células y se han asociado con una variedad de enfermedades. Como las proteínas de membrana integral son difíciles de trabajar debido principalmente a sus características bioquímicas, esto plantea un obstáculo importante para diseñar terapias dirigidas mejoradas y, lo que es más importante, comprender la biología de las rutas de señalización aberrantes asociadas con proteínas de membrana integral que conducen a numerosas enfermedades humanas.

En la presente invención, se presenta un novedoso e innovador sistema MaMTH, que combina el poder de un ensayo genético rápido y escalable con la ventaja de probar proteínas integrales de membrana integral y es aplicable para probar específicamente las interacciones de proteínas relacionadas con estados de enfermedad. El sistema se basa en la reconstrucción de ubiquitina a partir de mitades divididas y presenta varias ventajas sobre las técnicas existentes para estudiar los interactores de las proteínas de membrana: (i) MaMTH puede realizarse en

prácticamente cualquier línea celular debido a la disponibilidad de vectores presas/cebos/informadores para la generación de lentivirus, que presenta la ventaja de la integración de copia única y disminuye los artefactos de sobreexpresión. Además, MaMTH se lleva a cabo en células vivas, evitando así los cambios de señal derivados de la lisis celular o la purificación de proteínas utilizadas en los métodos bioquímicos de PPI; (ii) MaMTH es compatible con la técnica de clonación recombinante de Gateway, lo que permite un procedimiento de clonación rápido y fácil en todas las cadenas principales de vectores; (iii) MaMTH puede detectar cambios sutiles en los patrones de interacción, que pueden ser inducidos/reprimidos por fármacos, diversos estímulos o eventos de fosforilación, de una manera altamente específica; (iv) la sensibilidad y flexibilidad de MaMTH lo hace apto para la ampliación a formatos de alto rendimiento; (v) MaMTH puede usarse como una plataforma para el descubrimiento de fármacos, específicamente para cribar compuestos novedosos capaces de inhibir la señalización mediada por receptores oncogénicos.

En este estudio, nos centramos en probar las interacciones de proteínas implicadas en diversas enfermedades como el cáncer. Primero, se demuestra que MaMTH puede detectar la interacción inducida por el agonista entre el receptor acoplado a la proteína G (GPCR) $\beta 2$ -AR y su interactor citosólico β -arrestina³². Los GPCR a menudo se encuentran involucrados en diversas enfermedades y, debido a su papel principal en las vías de señalización, son objetivos principales para los medicamentos. Como muchas de sus proteínas interactoras no se han identificado hasta la fecha, MaMTH abre nuevas posibilidades para probar las proteínas asociadas de otros GPCR en estado ocupado o no ocupado por ligando.

En segundo lugar, nos centramos en la familia ErbB de receptores de tirosina quinasas, cuya sobreexpresión o mutación están involucradas en muchos cánceres³³. Se demuestra que MaMTH puede detectar con acierto el estado oncogénico de los receptores mutantes mediante la medición de proteínas adaptadoras asociadas. La perturbación de las interacciones entre las proteínas dependientes de fosfotirosina como Shc1 o Grb2 y los receptores mutados puede terminar o aliviar las firmas de cáncer como la proliferación celular no controlada. Además, MaMTH puede determinar la pérdida de interacción Shc1 inducida por Erlotinib en dos mutaciones de EGFR que se encuentran más comúnmente en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Además, MaMTH detectó un aumento del reclutamiento de Shc1 en el mutante secundario EGFR-L858R/T790M resistente a Erlotinib^{37, 47}. Erlotinib es un inhibidor de la tirosina-quinasa (TKI) y un potente fármaco contra el cáncer dirigido específicamente a EGFR mutante. La resistencia a TKI es un problema clínico importante, y dado que el 50% de los pacientes con CPNM que inicialmente responden a Erlotinib desarrollan la mutación T790M, esto enfatizó la necesidad de ensayos in vivo basados en células como MaMTH para probar nuevos agentes farmacéuticos dirigidos hacia la resistencia adquirida^{47 48}.

Finalmente, se expandió MaMTH para probar nuevos interactores EGFR y proporcionar información sobre las interacciones EGFR en forma Wt y mutante. Se pudo detectar el 76% de los interactores conocidos y, además, podríamos identificar más de 60 proteínas que no se ha demostrado previamente que interactúen con EGFR. Esto y aumentar la escala de MaMTH a aplicaciones de todo el genoma e incorporar datos de eliminación de ARNsh generados en diversas líneas celulares de cáncer de pulmón aumentará en gran medida el conocimiento de la señalización de EGFR y proporcionará una base para estudios mecanicistas en profundidad sobre cómo estos interactores influyen en la señalización de EGFR aberrante.

Tomado, en conjunto, se considera que MaMTH servirá como una plataforma poderosa para identificar que interactúan específicamente con las variantes de enfermedad de los receptores, lo que será de gran importancia para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de disfunciones asociadas con proteínas de membrana.

Tabla 1. Presas predichas utilizadas para la criba EGFR-Wt y EGFR-L858R

	Nombre del gen	EGFR-Wt media	EGFR-Wt σ	EGFR-L858R media	EGFR-L858R σ	Wt/L858R	SH2	PTB
1	ABL1	1.894	2.502	0.504	0.114	3.76	sí	
2	ABL2	4.633	1.355	4.465	0.143	1.04	sí	
3	ACTN4	4.215	0.524	2.239	0.926	1.88		
4	AKT1	4.121	0.211	3.115	1.634	1.32		
5	ANKS1A	9.265	0.618	11.756	1.891	0.79		
6	APBB2	3.055	1.290	2.918	0.769	1.05		
7	APBB3	0.506	0.085	0.972	0.298	0.52		
8	APP	0.929	0.112	2.181	0.586	0.43		

ES 2 811 874 T3

(continuación)

	Nombre del gen	EGFR-Wt media	EGFR-Wt σ	EGFR-L858R media	EGFR-L858R σ	Wt/L858R	SH2	PTB
9	APPL1	0.191	0.015	0.166	0.002	1.16		
10	APPL2	0.780	0.267	0.614	0.329	1.27		
11	AREG	0.855	0.197	0.655	0.177	1.30		
12	ARHGEF7	1.238	0.024	2.761	0.216	0.45		
13	ARRB1	2.716	0.094	6.575	1.323	0.41		
14	ARRB2	2.521	0.859	5.383	1.280	0.47		
15	ASAP2	1.766	0.824	0.975	0.769	1.81		
16	BAIAP2	4.832	0.544	7.370	3.366	0.66		
17	BCAR3	0.791	0.373	1.057	0.525	0.75	sí	
18	BLK	4.512	0.262	8.252	0.579	0.55	sí	
19	BLNK	0.606	0.227	0.719	0.309	0.84	sí	
20	BRAF	0.587	0.267	0.369	0.166	1.59		
21	BTC	0.531	0.141	0.473	0.236	1.12		
22	BTK	0.469	0.208	0.353	0.115	1.33	sí	
23	CALM1	10.260	1.812	19.357	5.062	0.53		
24	CAMLG	7.165	0.824	7.168	2.509	1.00		
25	CAV1	1.860	1.324	2.139	0.696	0.87		
26	CAV2	2.569	1.069	6.577	0.063	0.39		
27	CBLB	0.191	0.017	0.184	0.012	1.04	sí	
28	Cblc	0.983	0.656	0.398	0.343	2.47	sí	
29	CD33	0.370	0.169	1.237	0.522	0.30		
30	CD3E	1.387	0.802	0.758	0.347	1.83		
31	CDC25C	2.125	0.796	3.940	0.293	0.54		
32	Cdh1	2.137	0.613	2.267	0.250	0.94		
33	CDH5	2.216	1.028	2.627	0.562	0.84		
34	CDK1	1.641	0.300	1.969	0.220	0.83		
35	CISH	1.294	0.652	2.664	0.672	0.49	sí	
36	Clbc	0.178	0.052	0.342	0.137	0.52		
37	CLTA	0.143	0.097	0.111	0.032	1.29		
38	CRK	4.007	0.185	9.356	0.938	0.43	sí	
39	CRKII	7.287	0.342	12.623	1.041	0.58		
40	CRKL	10.248	1.230	13.647	1.301	0.75	sí	
41	CSK	8.401	2.023	5.863	2.914	1.43	sí	
42	CTNNA1	2.115	1.731	1.339	0.661	1.58		
43	CTNND1	3.004	1.198	3.626	0.920	0.83		
44	CTTN	33.809	4.327	22.111	2.042	1.53		

ES 2 811 874 T3

(continuación)

	Nombre del gen	EGFR-Wt media	EGFR-Wt σ	EGFR-L858R media	EGFR-L858R σ	Wt/L858R	SH2	PTB
45	DDR1	0.927	0.210	0.942	0.226	0.98		
46	DLG3	0.377	0.183	0.182	0.094	2.07		
47	DNAJA3	1.183	1.401	1.062	0.348	1.11		
48	DOK1	5.168	0.919	13.097	2.019	0.39		
49	DOK2	0.056	0.028	0.026	0.015	2.15		
50	DOK4	0.971	0.245	0.802	0.375	1.21		
51	DOK6	1.215	0.149	1.320	0.145	0.92		
52	EPHB2	0.355	0.055	0.119	0.062	3.00		
53	EPHB3	0.380	0.157	0.305	0.139	1.25		
54	EPS8	2.618	1.672	5.580	3.393	0.47		sí
55	ESR1	0.196	0.008	0.306	0.248	0.64		
56	EZR	8.300	2.637	5.004	0.934	1.66		
57	FASLG	0.852	0.135	1.150	1.032	0.74		
58	FES	0.933	0.338	0.785	0.312	1.19	sí	
59	FGR	2.618	1.026	4.987	0.401	0.52	sí	
60	FLT1	0.257	0.060	0.437	0.326	0.59		
61	FRK	2.840	0.452	5.363	1.287	0.53	sí	
62	FYN	0.627	0.206	0.382	0.193	1.64	sí	
63	GAB1	0.934	0.247	2.301	0.520	0.41		
64	GAB2	0.968	0.373	1.273	0.766	0.76		
65	Gapdh	3.443	0.462	3.789	0.620	0.91		
66	GHRHR	0.783	0.215	0.821	0.381	0.95		
67	GRAP2	1.789	0.289	8.118	2.349	0.22	sí	
68	GRB10	3.145	0.951	3.488	0.555	0.90	sí	
69	Grb2	10.033	0.617	35.370	1.986	0.28	sí	
70	Grb7	0.952	0.676	0.577	0.189	1.65	sí	
71	HCK	3.942	0.834	3.958	0.901	1.00	sí	
72	HDAC1	0.532	0.162	0.757	0.164	0.70		
73	HDAC6	24.861	2.741	14.896	2.723	1.67		
74	HDAC7	2.372	0.832	4.347	0.848	0.55		
75	HRAS	0.411	0.229	0.751	0.342	0.55		
76	Hsp90aa1	74.199	6.957	97.063	1.600	0.76		
77	HSP90AB1	27.578	6.513	14.811	6.636	1.86		
78	HSPA1A	12.770	4.200	19.200	6.7	0.67		
79	HSPA4	1.135	0.746	2.477	0.252	0.46		
80	HSPA8	25.000	5.000	39.200	8.100	0.64		

ES 2 811 874 T3

(continuación)

	Nombre del gen	EGFR-Wt media	EGFR-Wt σ	EGFR-L858R media	EGFR-L858R σ	Wt/L858R	SH2	PTB
81	IGF1R	0.565	0.084	0.750	0.363	0.75		
82	IKBKG	8.279	3.171	6.547	1.869	1.26		
83	INPP5D	0.433	0.103	0.678	0.111	0.64	sí	
84	IRS1	0.635	0.226	0.154	0.084	4.14		
85	ITGB2	2.618	0.206	0.829	0.537	3.16		
86	ITK	2.208	0.742	0.941	0.821	2.35	sí	
87	ITSN2	2.093	0.728	0.598	0.204	3.50		
88	JAK2	0.199	0.179	0.066	0.045	2.99	sí	
89	JUP	0.983	0.107	2.514	2.025	0.39		
90	LAT	29.540	3.291	18.388	7.232	1.61		
91	LCK	0.374	0.271	0.510	0.344	0.73	sí	
92	LCP2	2.708	1.271	6.293	0.640	0.43	sí	
93	LRP1	0.923	0.408	1.863	0.260	0.50		
94	LYN	6.921	0.569	9.741	1.446	0.71	sí	
95	MAP3K13	0.528	0.151	0.424	0.284	1.24		
96	MAP3K3	2.013	0.295	3.462	0.464	0.58		
97	MAP4K1	1.510	0.330	1.758	0.565	0.86		
98	MAPK8	3.295	1.699	5.129	0.391	0.64		
99	MAPK81P1	0.532	0.177	0.297	0.191	1.79		
100	MAPK8IP2	1.516	0.169	1.628	0.129	0.93		
101	MAPK8IP3	0.335	0.052	0.150	0.076	2.22		
102	MAPK9	1.483	0.981	2.832	0.526	0.52		
103	MAPT	5.592	0.829	6.862	0.403	0.81		
104	MATK	0.092	0.009	0.088	0.057	1.05	sí	
105	MDM2	0.439	0.152	0.403	0.057	1.09		
106	MED28	0.865	0.163	1.138	0.600	0.76		
107	MERTK	0.173	0.122	0.368	0.199	0.47		
108	MUC1	1.094	0.224	4.179	3.936	0.26		
109	NCK1	2.204	0.588	2.154	1.250	1.02	sí	
110	NCK2	4.347	1.027	4.870	1.633	0.89	sí	
111	NEDD4	0.355	0.079	0.181	0.111	1.96		
112	NEDD9	0.458	0.322	0.328	0.161	1.39		
113	NR3C1	3.209	0.196	2.586	1.230	1.24		
114	NRG1	7.339	3.278	8.101	3.087	0.91		
115	NTRK2	1.566	0.336	0.971	0.150	1.61		
116	PAK1	1.496	1.817	2.702	0.654	0.55		

ES 2 811 874 T3

(continuación)

	Nombre del gen	EGFR-Wt media	EGFR-Wt σ	EGFR-L858R media	EGFR-L858R σ	Wt/L858R	SH2	PTB
117	PDCD6IP	7.391	1.814	14.051	0.623	0.53		
118	Pdgfra	9.182	1.985	13.730	5.467	0.67		
119	PDGFRb	0.233	0.205	0.096	0.013	2.42		
120	PIK3C2B	1.226	0.852	4.297	0.521	0.29		
121	PIK3CA	0.089	0.075	0.053	0.059	1.68		
122	PIK3R1	0.294	0.074	0.460	0.055	0.64	sí	
123	PIK3R2	1.173	0.381	3.251	0.620	0.36	sí	
124	PIK3R3	1.549	0.329	2.402	0.615	0.64	sí	
125	PIM1	1.911	0.211	1.510	0.210	1.27		
126	PLCG2	3.986	1.543	2.427	1.317	1.64	sí	
127	PPP2R2B	0.624	0.042	0.640	0.328	0.98		
128	PRKCA	11.129	3.152	7.698	2.444	1.45		
129	PRKCE	6.301	3.938	6.774	4.744	0.93		
130	PRKCH	0.817	0.033	0.883	0.016	0.92		
131	PRKCZ	2.493	0.453	0.892	0.244	2.79		
132	PTK2	4.046	0.318	5.587	1.097	0.72		
133	PTPN1	44.557	2.651	55.899	9.522	0.80		
134	PTPN11	0.086	0.029	0.253	0.298	0.34	sí	
135	PTPN12	2.637	1.507	1.201	0.299	2.20		
136	PTPN14	0.402	0.194	0.488	0.296	0.82		
137	PTPN18	1.538	0.544	2.180	0.876	0.71		
138	PTPN2	1.267	0.256	1.356	0.981	0.93		
139	PTPN22	2.986	4.641	0.363	0.064	8.23		
140	PTPN6	1.507	0.624	1.431	1.505	1.05	sí	
141	PTPRA	0.333	0.214	0.814	0.292	0.41		
142	PTPRM	0.354	0.182	0.355	0.195	1.00		
143	Pxn	0.341	0.102	0.272	0.087	1.26		
144	RAF1	4.906	0.419	3.809	0.502	1.29		
145	RAPGEF1	3.476	0.440	3.149	0.509	1.10		
146	RELA	1.271	0.521	1.177	0.767	1.08		
147	RET	2.347	0.744	1.071	0.542	2.19		
148	Rqs4	0.575	0.262	1.392	0.595	0.41		
149	RIN1	2.189	1.648	1.842	0.655	1.19	sí	
150	ROS1	0.504	0.186	0.264	0.051	1.91		
151	S100A4	1.722	0.519	4.461	1.491	0.39		
152	SFN	5.605	0.681	14.701	0.391	0.38		

ES 2 811 874 T3

(continuación)

	Nombre del gen	EGFR-Wt media	EGFR-Wt σ	EGFR-L858R media	EGFR-L858R σ	Wt/L858R	SH2	PTB
153	SH2B1	2.988	0.974	3.761	1.349	0.79	sí	
154	SH2B3	0.248	0.082	0.227	0.066	1.09	sí	
155	SH2D2A	0.228	0.158	0.436	0.104	0.52	sí	
156	SH2D3A	4.752	0.627	7.233	1.568	0.66	sí	
157	SH2D3C	2.333	0.399	2.924	0.755	0.80	sí	
158	SH3BP2	0.337	0.095	0.532	0.153	0.63	sí	
159	SH3GL1	0.812	0.632	0.718	0.319	1.13		
160	SH3GL2	4.583	0.341	7.850	1.261	0.58		
161	SH3GL3	3.413	0.550	3.258	1.017	1.05		
162	SH3KBP1	0.543	0.337	1.102	0.556	0.49		
163	Shc1	13.893	1.250	21.648	3.644	0.64	sí	
164	SHC4	5.313	0.844	11.387	1.366	0.47	sí	
165	SLA	2.783	2.074	1.160	0.237	2.40	sí	
166	SLA2	2.222	0.874	3.113	0.086	0.71	sí	
167	SNCA	8.214	1.575	9.827	4.881	0.84		
168	SNX9	1.670	0.371	1.894	0.291	0.88		
169	SOCS3	1.594	0.664	9.826	4.051	0.16	sí	
170	SOCS5	0.294	0.121	0.876	0.278	0.34	sí	
171	SOCS6	1.224	0.342	5.900	0.979	0.21	sí	
172	SOS2	0.283	0.053	1.834	0.341	0.15		
173	Src	11.156	1.745	12.900	0.542	0.86	sí	
174	STAM	0.564	0.349	2.495	1.227	0.23		
175	STAM2	0.494	0.266	1.349	0.120	0.37		
176	STAP2	2.763	0.201	1.488	0.965	1.86	sí	
177	STAT1	4.705	0.594	6.800	2.807	0.69	sí	
178	STAT2	0.838	0.243	3.034	0.258	0.28	sí	
179	STAT3	7.348	2.861	4.199	0.719	1.75	sí	
180	STAT5A	3.116	1.055	3.261	1.111	0.96	sí	
181	STUB1	10.282	1.710	7.036	1.455	1.46		
182	SYK	0.761	0.219	0.956	0.606	0.80	sí	
183	TAB1	5.840	2.812	5.948	1.401	0.98		
184	TBK1	0.285	0.150	0.334	0.064	0.85		
185	TENC1	0.738	0.263	0.193	0.229	3.83	sí	sí
186	TGFA	2.523	1.649	1.590	0.931	1.59		
187	TLR2	0.578	0.195	1.692	1.120	0.34		
188	TNFRSF1A	8.777	2.653	7.369	2.573	1.19		

(continuación)

	Nombre del gen	EGFR-Wt media	EGFR-Wt σ	EGFR-L858R media	EGFR-L858R σ	Wt/L858R	SH2	PTB
189	TNK2	1.512	1.618	1.299	0.802	1.16		
190	TNS3	1.395	0.581	3.120	0.509	0.45	sí	sí
191	TP53	0.713	0.259	1.765	0.699	0.40		
192	TRAF2	7.278	1.243	3.472	0.749	2.10		
193	TUBA1A	1.117	0.474	2.662	0.558	0.42		
194	TXN	5.099	0.852	7.026	0.402	0.73		
195	TYK2	0.570	0.075	0.790	0.201	0.72	sí	
196	VAV1	1.454	0.106	2.675	0.143	0.54	sí	
197	WAS	0.231	0.198	0.149	0.084	1.56		
198	WASF3	1.303	0.688	2.154	0.198	0.61		
199	WASL	1.411	0.134	1.933	0.295	0.73		
200	YES1	1.913	0.767	1.233	0.260	1.55	sí	
201	YWHAB	7.392	2.991	10.442	2.583	0.71		
202	YWHAB	1.338	0.795	0.868	0.027	1.54		
203	YWHAG	1.323	0.954	1.415	0.671	0.93		
204	YWHAQ	8.195	1.358	11.957	3.303	0.69		
205	YWHAZ	7.577	0.892	13.937	3.130	0.54		
206	ZAP70	16.923	0.872	16.203	0.977	1.04	sí	

Tabla 2 - Interactores EGFR identificados (los interactores EGFR previamente desconocidos se muestran en negrita)

	Gen	EGFR-Wt media	EGFR-L858R media	Wt/L858R	SH2	PTB
1	SOS2	0.28	1.83	0.15		
2	SOCS3	1.59	9.83	0.16	sí	
3	SOCS6	1.22	5.90	0.21	sí	
4	GRAP2	1.79	8.12	0.22	sí	
5	STAM	0.56	2.49	0.23		
6	MUC1	1.09	4.18	0.26		
7	STAT2	0.84	3.03	0.28	sí	
8	Grb2	10.03	35.37	0.28	sí	
9	PIK3C2B	1.23	4.30	0.29		
10	CD33	0.37	1.24	0.30		
11	TLR2	0.58	1.69	0.34		
12	PIK3R2	1.17	3.25	0.36	sí	
13	STAM2	0.49	1.35	0.37		
14	SFN	5.60	14.70	0.38		
15	S100A4	1.72	4.46	0.39		
16	CAV2	2.57	6.58	0.39		
17	JUP	0.98	2.51	0.39		

(continuación)

	Gen	EGFR-Wt media	EGFR-L858R media	Wt/L858R	SH2	PTB
18	DOK1	5.17	13.10	0.39		
19	TP53	0.71	1.77	0.40		
20	GAB1	0.93	2.30	0.41		
21	ARRB1	2.72	6.57	0.41		
22	Rgs4	0.58	1.39	0.41		
23	TUBA1A	1.12	2.66	0.42		
24	APP	0.93	2.18	0.43		
25	LCP2	2.71	6.29	0.43	sí	
26	TNS3	1.39	3.12	0.45	sí	sí
27	ARHGEF7	1.24	2.76	0.45		
28	HSPA4	1.13	2.48	0.46		
29	SHC4	5.31	11.39	0.47	sí	
30	ARRB2	2.52	5.38	0.47		
31	EPS8	2.62	5.58	0.47		sí
32	CISH	1.29	2.66	0.49	sí	
33	SH3KBP1	0.54	1.10	0.49		
34	LRP1	0.92	1.86	0.50		
35	MAPK9	1.48	2.83	0.52		
36	PDCD6IP	7.39	14.05	0.53		
37	FRK	2.84	5.36	0.53	sí	
38	CALM1	10.26	19.36	0.53		
39	CDC25C	2.12	3.94	0.54		
40	VAV1	1.45	2.68	0.54	sí	
41	YWHAZ	7.58	13.94	0.54		
42	HDAC7	2.37	4.35	0.55		
43	BLK	4.51	8.25	0.55	sí	
44	PAK1	1.50	2.70	0.55		
45	CRKII	7.29	12.62	0.58		
46	MAP3K3	2.01	3.46	0.58		
47	SH3GL2	4.58	7.85	0.58		
48	WASF3	1.30	2.15	0.61		
49	HSPA8	25.00	39.20	0.64		
50	Shc1	13.89	21.65	0.64	sí	
51	MAPK8	3.30	5.13	0.64		
52	PIK3R3	1.55	2.40	0.64	sí	
53	BAIAP2	4.83	7.37	0.66		
54	SH2D3A	4.75	7.23	0.66	sí	
55	HSPA1A	12.77	19.20	0.67		
56	Pdgfra	9.18	13.73	0.67		
57	YWHAQ	8.19	11.96	0.69		

(continuación)

	Gen	EGFR-Wt media	EGFR-L858R media	Wt/L858R	SH2	PTB
58	STAT1	4.70	6.80	0.69	sí	
59	PTPN18	1.54	2.18	0.71		
60	YWHAB	7.39	10.44	0.71		
61	LYN	6.92	9.74	0.71	sí	
62	SLA2	2.22	3.11	0.71	sí	
63	PTK2	4.05	5.59	0.72		
64	TXN	5.10	7.03	0.73		
65	WASL	1.41	1.93	0.73		
66	FASLG	0.85	1.15	0.74		
67	BCAR3	0.79	1.06	0.75	sí	
68	CRKL	10.25	13.65	0.75	sí	
69	GAB2	0.97	1.27	0.76		
70	MED28	0.87	1.14	0.76		
71	Hsp90aa1	74.20	97.06	0.76		
72	ANKS1A	9.27	11.76	0.79		
73	SH2B1	2.99	3.76	0.79	sí	
74	PTPN1	44.56	55.90	0.80		
75	SH2D3C	2.33	2.92	0.80	sí	
76	MAPT	5.59	6.86	0.81		
77	CTNND1	3.00	3.63	0.83		
78	CDK1	1.64	1.97	0.83		
79	SNCA	8.21	9.83	0.84		
80	CDH5	2.22	2.63	0.84		
81	MAP4K1	1.51	1.76	0.86		
82	Src	11.16	12.90	0.86	sí	
83	CAV1	1.86	2.14	0.87		
84	SNX9	1.67	1.89	0.88		
85	NCK2	4.35	4.87	0.89	sí	
86	GRB10	3.14	3.49	0.90	sí	
87	NRG1	7.34	8.10	0.91		
88	Gapdh	3.44	3.79	0.91		
89	DOK6	1.22	1.32	0.92		
90	PRKCE	6.30	6.77	0.93		
91	MAP K8I P2	1.52	1.63	0.93		
92	PTPN2	1.27	1.36	0.93		
93	YWHAG	1.32	1.42	0.93		
94	Cdh1	2.14	2.27	0.94		
95	STAT5A	3.12	3.26	0.96	sí	
96	TAB1	5.84	5.95	0.98		
97	HCK	3.94	3.96	1.00	sí	

(continuación)

	Gen	EGFR-Wt media	EGFR-L858R media	Wt/L858R	SH2	PTB
98	CAMLG	7.16	7.17	1.00		
99	NCK1	2.20	2.15	1.02	sí	
100	ABL2	4.63	4.47	1.04	sí	
101	ZAP70	16.92	16.20	1.04	sí	
102	APBB2	3.05	2.92	1.05		
103	SH3GL3	3.41	3.26	1.05		
104	PTPN6	1.51	1.43	1.05	sí	
105	RELA	1.27	1.18	1.08		
106	RAPGEF1	3.48	3.15	1.10		
107	DNAJA3	1.18	1.06	1.11		
108	TNK2	1.51	1.30	1.16		
109	RIN1	2.19	1.84	1.19	sí	
110	TNFRSF1A	8.78	7.37	1.19		
111	NR3C1	3.21	2.59	1.24		
112	IKBK	8.28	6.55	1.26		
113	PIM1	1.91	1.51	1.27		
114	RAF1	4.91	3.81	1.29		
115	AKT1	4.12	3.11	1.32		
116	CSK	8.40	5.86	1.43	sí	
117	PRKCA	11.13	7.70	1.45		
118	STUB1	10.28	7.04	1.46		
119	CTTN	33.81	22.11	1.53		
120	YES1	1.91	1.23	1.55	sí	
121	CTNNA1	2.11	1.34	1.58		
122	TGFA	2.52	1.59	1.59		
123	LAT	29.54	18.39	1.61		
124	NTRK2	1.57	0.97	1.61		
125	PLCG2	3.99	2.43	1.64	sí	
126	EZR	8.30	5.00	1.66		
127	HDAC6	24.86	14.90	1.67		
128	STAT3	7.35	4.20	1.75	sí	
129	ASAP2	1.77	0.97	1.81		
130	CD3E	1.39	0.76	1.83		
131	STAP2	2.76	1.49	1.86	sí	
132	HSP90AB1	27.58	14.81	1.86		
133	ACTN4	4.21	2.24	1.88		
134	TRAF2	7.28	3.47	2.10		
135	RET	2.35	1.07	2.19		
136	PTPN12	2.64	1.20	2.20		
137	ITK	2.21	0.94	2.35	sí	

(continuación)

	Gen	EGFR-Wt media	EGFR-L858R media	Wt/L858R	SH2	PTB
138	FGR	2.62	4.99	0.52	sí	
139	SLA	2.78	1.16	2.40	sí	
140	PRKCZ	2.49	0.89	2.79		
141	ITGB2	2.62	0.83	3.16		
142	ITSN2	2.09	0.60	3.50		
143	ABL1	1.89	0.50	3.76	sí	
144	PTPN22	2.99	0.36	8.23		

Tabla 3. Confirmación de aciertos de MaMTH por LUMIER (valor p <0.05)

1	APBB2
2	CAMLG
3	CISH
4	CRKII
5	FGR
6	GRAP2
7	HDAC7
8	HSP90AB1
9	HSPA1A
10	HSPA8
11	LAT
12	LCP2
13	MUC1
14	NR3C1
15	PDGFRA
16	PIK3C2B
17	PLCG2
18	PRKCA
19	PTPN22
20	SH2D3A
21	SHC1
22	SHC4
23	STAT1
24	TNS3

Tabla 5: Esqueletos de vectores MaMTH

Vectores de presa de destino		Características
pCMV-y/hNubl-tripleFLAG-enlazador-Gateway	Plásmido de Nubi con etiqueta N para transfección	CMV-promotor, Kozak (GCCACC)-casete de levadura o humano Nubl (aa1-37)-3xFLAG-(GGGGS)2-Gatewav
pCMV-y/hNubV-tripleFLAG-enlazador-Gateway	Plásmido de NubV con etiqueta N para transfección	CMV-promotor, Kozak (GCCACC)-casete de levadura o humano NubV (aa1-37)-3xFLAG-(GGGGS)2-Gatewav
pCMV-y/hNubA-tripleFLAG-enlazador-Gateway	Plásmido de NubA con etiqueta N para transfección	CMV-promotor, Kozak (GCCACC)-casete de levadura o humano NubA (aa1-37)-3xFLAG-(GGGGS)2-Gatewav
pCMV-y/hNubG-tripleFLAG-enlazador-Gateway	Plásmido de NubG con etiqueta N para transfección	CMV-promotor, Kozak (GCCACC)-casete de levadura o humano NubG (aa1-37)-3xFLAG-(GGGGS)2-Gatewav
pCMV-Gateway-enlazador-tripleFLAG-v/hNubi	Plásmido de Nubi con etiqueta C para transfección	Promotor de CMV, casete Gateway, (GGGGS)2-3xFLAG-veast o Nubi humano (aa1-37)
pCMV-Gateway-enlazador-tripleFLAG-v/hNubV	Plásmido de NubV con etiqueta C para transfección	Promotor de CMV, casete Gateway, (GGGGS) 2-3xFLAG-veast o NubV humano (aa1-37)
pCMV-Gateway-enlazador-tripleFLAG-v/hNubA	Plásmido de NubA con etiqueta C para transfección	Promotor de CMV, casete Gateway, (GGGGS) 2-3xFLAG-veast o NubA humano (aa1-37)
pCMV-Gateway-enlazador-tripleFLAG-v/hNubG	Plásmido de NubG con etiqueta C para transfección	Promotor de CMV, casete Gateway, (GGGGS) 2-3xFLAG-veast o NubG humano (aa1-37)
pLV-CMV-y/hNubl-tripleFLAG-enlazador-Gatewav-PuroR	plásmido nubi-marcado lentiviral N, marcador de puromicina	CMV-promotor, Kozak (GCCACC)-casete de levadura o humano Nubl (aa1-37)-3xFLAG-(GGGGS)2-Gateway
pLV-CMV-Gateway-enlazador-tripleFLAG-v/hNubi	plásmido nubi-marcado lentiviral C, marcador de puromicina	Promotor de CMV, casete Gateway, (GGGGS)2-3xFLAG-veast o Nubi humano (aa1-37)
Vectores de cebo de destino		
pCMV-Gateway-enlazador-GAL4-mNfκB-V5	C-tagged-enlazador-Cub-GAL4-mNfκB-V5 cebo para transfección	CMV-promotor, cassette Gateway, (GGGGS)2, Cub-GAL4(aa1-147)-mNfκB(aa364-550)-V5
pCMV-Gateway-enlazador-mLexAVP16	C-tagged-enlazador-Cub-mLexA-VP16 cebo para transfección	CMV-promotor, cassette Gateway, (GGGGS)2, Cub-mLexA(aa1-202)-VP16(aa413-490)-V5
pLV-CMV-Gateway-enlazador-GAL4-mNfκB-V5-PuroR	cebo lentiviral C-tagged-enlazador-Cub-GAL4-mNfκB-V5, marcador de puromicina	CMV-promotor, cassette Gateway, (GGGGS)2, Cub-GAL4(aa1-147)-mNfκB (aa364-550)-V5
pLV-CMV-Gateway-enlazador-mLexAVP16-PuroR	cebo lentiviral C-tagged-enlazador-Cub-mLexA-VP16, marcador de puromicina	CMV-promotor, cassette Gateway, (GGGGS)2, Cub-mLexA(aa1-202)-VP16 (aa413-490)-V5
Constructos de informador lentiviral		

Constructos de informador lentiviral		
pLV-5xGAL4-luciferasa-higroR	informador de luciferasa lentiviral (sitios de unión a 5xGAL4UAS), marcador de higromicina	5x luciferasa GAL4 UAS-TATA caja-luciérnaga
pLV-5xGAL4-GFP-higroR	informador lentiviral de GFP (sitios de unión a 5xGAL4UAS), marcador de higromicina	5xGAL4UAS-TATAcaja-eGFP
pLV-8xlexAops-luciferasa-higroR	informador de luciferasa lentiviral (sitios de unión 8xlexAops), marcador de higromicina	8xlexAops-TATAcaja-firefly luciferasa
pLV-8xlexAops-GFP-higroR	Informador lentiviral de GFP (sitios de unión 8xlexAops), marcador de higromicina	8xlexAops-TATAcaja-eGFP
Otros vectores de expresión utilizados		
pCMV-Gatewav-tripleFLAG	C-terminal tripleFLAG-etiquetado para transfección	CMV-3xFLAG, cassette Gateway
pCMV-tripleFLAG-Gateway	N-terminal tripleFLAG-etiquetado para transfección	CMV-3xFLAG, cassette Gateway

Tabla 6 - Cebadores para generar todos los reactivos MaMTH

Cebadores de reparación de brecha de cebo para clonar en pCCW-Ste-NotI/Fspl	
Cub-mLexA-GAL4	
mLexA-GAL4_F1	aaggctaaagagggtgtaigcacagatcagctgcggccgcagtaaaagcgtaaacggccag
mLexA-GAL4_R1	acaatgagctatcagcaatattcccactttgattaaaaatgaattccagccagtcgccgt
mLexA-GAL4_F2	tggcgttgggttatttcgcaacggcgactggctggaattcaattttatcaaaagtggga
mLexA-GAL4_R2	aatgcgcgcctacacagggcgctgcgcgcattgcgccattcattactcttttttgggtttg
Cub-LexA-VP16	
LexA-VP16	todos los cebadores son iguales a mLexA-VP16
mLexA-VP16_F1	igual que mLexA-GAL4_F1
mLexA-VP16_R1	agtggagctctgtccccaggtgacatcggtcgggggggccagatcccggggaattccagcca gtcgcctt
mLexA-VP16_F2	cggttgggttatttcgcaacggcgactggctggaattcccgggggtctggggccccccgaccgat gtcag
mLexA-VP16_R2	aatgcgcgcctacagggcgctgcgcgcattgcgccattcactaccacccgtactcgtcaa
Cub-mLexA-mNFkB364-550	
mLexA-mNFkB-364-550_F1	igual que mLexA-GAL4_F1
mLexA-mNFkB-364-550_R1	ggtttgagatctgccctgatgtaacagcatgggggaaaaccagatccccgggaattccagccag tcgccgt
mLexA-mNFkB-364-550_F2	ggcggttgggttatttcgcaacggcgactggctggaattcccgggggtctgtttcccccatgtctgtt acca
mLexA-mNFkB-364-550_R2_V5tag	igual que Gal4-mNFkB-364-550_R2_V5
mLexA-mNFkB-364-550_R3	igual que Gal4-mNFkB-364-550_R3
Cub-mLexA-hNFkB451-549	
mLexA-hNFkB-451-549_F1	igual que mLexA-GAL4_F1

(continuación)	
Cub-mLexA-hNFkB451-549	
mLexA-hNFkB-451-549_R1	tgaacacagctgggtctgtgtgtgccaagcaagccccccagatccccgaattccagccagtcg
mLexA-hNFkB-451-549_F2	ccqtt
mLexA-hNFkB-451-549_R2	gttatcgcaacggcgactggctggaattcgggatcggggcjqccitgcttggcaaca
mLexA-hNFkB-451-549_R3	igual que Gal4-hNFkB-451-550_R2_V5tag
mLexA-hNFkB-451-549_R3	igual que Gal4-mNFkB-364-550_R3
Cub-mLexA-hNFkB521-549	
mLexA-hNFkB-521-549_F1	igual que mLexA-GAL4_F1
mLexA-hNFkB-521-549_R1	ggagaagtcctcatctcctgaaaggaggccattggggagccccggcagatccccgaattccagc
mLexA-hNFkB-521-549_F2	caqtcgccgt
mLexA-hNFkB-521-549_R2	ggcggtgggttatctgcgaacggcgactggctggaattcgggatcggcggtctccccaatgg
mLexA-hNFkB-521-549_R3	cctcc
mLexA-hNFkB-521-549_R3	igual que Gal4-hNFkB-451-550_R2_V5tag
Cub-mLexA-VP16-trimero	igual que Gal4-mNFkB-364-550_R3
mLexA-VP16-trimero_F1	igual que mLexA-GAL4_F1
mLexA-VP16-trimero_R1	caacatgtccagatcgaaatcgtcttagcgctgctacggtgcqaattccagcagtc
mLexA-VP16-trimero_R2	gtgccagatatccaagcaaaagcatccaatgatactcactaccaccaacacatgccagtcgaat
mLexA-VP16-trimero_R3	actaccaagcatgtcttagatcgaaagtcgtcaagagcgctgctgccagcatatccaa
mLexA-VP16-trimero_R4_V5tag	ttacgtagaatcgagaccgagagggttaggggttaccactaccactaccagcatgtctagat
Cub-mLexA-VP16-dimero	
mLexA-VP16-dimero_F1	igual que mLexA-GAL4_F1
mLexA-VP16-dimero_R1	actaccacaacatgtccagatcgaaatcgtcttagcgctgctagcggtgcogaattccagccagtc
mLexA-VP16-dimero_R2	gcc
mLexA-VP16-dimero_R2	tiagctgtggtactaccagcatatccaagtcaaaagtcataccaatgcatactactaccaccaatgtcc
mLexA-VP16-dimero_R2	aga

(continuación)	
Cub-GAL4-mNFkB364-550	
Gal4-mNFkB-364-550_F1	cttgtgctaaggctaagagggtggtatgcacagatcagcttttgcacgggtatcgataagcttgatgaa gctactgtcttctat
Cebadores de reparación de brecha de cebo para clonar en pCCW-Ste-NotI/Fspl	
Gal4-mNFkB-364-5508_R1	ggtttgatctgccctgctatggttaacagcatggggaaaaatcgatacagtcactgtc
Gal4-mNFkB-364-550_F2	gagtagtaacaagaaggccaagacagttgactgtatcgattttttcccccaatgctgttacc
Gal4-mNFkB-364-550_R2_V5	ttacgtagaatcgagaccgagaggaggggttagggataggccttaccctcgccacctccgggagctga tctgactcaaaa
Gal4-mNFkB-364-550_R3	aatggccgctacagggcgctgcgcgccattcgccattcattacgtagatcgagaccga
Cub-GAL4-mNFkB451-550	
Gal4-mNFkB-451-550_F1	igual que Gal4-NFkB-364-550_F1
Gal4-mNFkB-451-550_R1	tgaactctctgggtctgtgtgtccaagcaagggcccccaatcgatacagtcactgtg
Gal4-mNFkB-451-550_F2	agtagtaacaagaaggccaagacagctgactgtatcgattggccttctgtggcaacagca
Gal4-mNFkB-451-550_F1	igual que Gal4-NFkB-364-550_R2_V5
Gal4-mNFkB-451-550_F1	igual que Gal4-NFkB-364-550_R3
Cub-GAL4-hNFkB451-549	
Gal4-hNFkB-451-549_F1	igual que Gal4-NFkB-364-550_F1
Gal4-hNFkB-451-549_R1	agctgggtctgtgtgtccaagcaagggcccccaatcgatacagtcactgtg
Gal4-hNFkB-451-549_F2	aaaggtcaagacacagctgactgtatcgattggggtggggccttctgtggcaacagc
Gal4-hNFkB-451-549_R2_V5tag	ttacgtagaatcgagaccgagaggaggggttagggataggccttaccggagctgactgactagca gg
Gal4-hNFkB-451-549_R3	igual que Gal4-mNFkB-364-550_R3
Cub-GAL4-hNFkB521-549	
Gal4-hNFkB-521-549_F1	igual que Gal4-NFkB-364-550_F1
Gal4-hNFkB-521-549_R1	cttcactctgaaaggaggccattgcgggagccccggccagatcccaatcgatacagtcactgtc

(continuación)	
Cub-GAL4-hNFkB521-549	
Gal4-hNFkB-521-549_F2	gtagtaacaaagggtcaagacagttgactgtatcgattgggaltcggcgggggtcccccaatggc c
Gal4-hNFkB-521-549_R2_V5tag	igual que Gal4-hNFkB-451-550_R2_V5tag
Gal4-hNFkB-521-549_R3	igual que Gal4-mNFkB-364-550_R3
Clonación de TFs en vectores de expresión	
TF con GAL4-NFkB:	
TF_Gal4_F_KpnI	acgtaggtagcctgaagctactgtctctatcgaacaag
TF_Gal4_R_XbaI V5	acgtatctagattacgtagaatcgagaccgaggag
TF con mLexA o LexA	
TF_mLexA_F_KpnI	acgtaggtagcctgaagcgttaacggccagg
TF_mLexA-VP16_R_XbaI	acgtatctagactaccacccgtactcgtcaaa
TF_mLexA-GAL4_R_XbaI	acgta tctaga ttactcttttttgggttggtgggta
TF_Gal4_R_XbaI V5	para TF9,10
TF_mLexA-VP16dimer_R_XbaI	acgta tctaga ttagctcgtgtactaccagc
Cebadores para clonación para crear vectores de destino de cebo	
Linker_C-taggd_baits_XbaI	acgta tctaga ggtagcggtggctctggagggtgggtccatgtcggggggatccctcc
reversa_unión a V5_XbaI	acgtatctagattacgtagaatcgagaccgagg
reversa_unión a VP16_XbaI	acgtatctagactaccacccgtactcgtcaatt
enlazador_C-etiquetada_cebos_EcoRV	ggtagcggtggctcaggagggtgggtccatgtcggggggggtccctcc
reversa_unión a V5_BstBI	acgtattcgaattacgtagaatcgagaccgagg
reversa_unión a VP16_BstBI	acgtattcgaactaccacccgtactcgtcaatt

(continuación)	
Creación de vectores de destino de presas (yNubi)	
N-presa_etiquetada_F_KpnI	acgttaggtaccgccaccatgcagatttttgcgaagactttg
N-presa_etiquetada_R1_FLAGtag	ctgtcatcgtcatccttctgtatcgtatgcttattataatcacccgtcatggtctttgttagtcaggat accttctgtcttg
N-presa_etiquetada_R2_HindIII	acgttaaagcttggaccaccaccctccagagccacccacctgtgtcatcgtctctgt
C-presa_etiquetada_F1	gactacaaagaccatgacgggtgattataaaatcatgacatcgattacaagatgacgatgacaa
Cebadores de reparación de brecha de cebo para clonar en pCCW-Sie- NotI/FspI	
	gatgcagattttgtcaagac
C-presa_etiquetada_R1_XbaI	acgtatctagattagataccttctctgtcttgaatt
C-presa_etiquetada_F2_XbaI	acgtatctagagggtggcggtggtctctggagggtggtgcgactacaaagaacatgacgg
Creación de vectores de destino de presas (hNubi)	
N-presa_etiquetada_F_KpnI	acgttaggtaccgccaccatgcagatcttctgtgaaac
N-presa_etiquetada_R1_FLAGtag	ctgtcatcgtcatccttctgtatcgtatgcttattataatcacccgtcatggtctttgttagtcgggaat gccctcttattcttg
N-presa_etiquetada_R2_HindIII	igual que N-presa_etiquetada_R2_HindIII
N-presa_etiquetada_F_NheI	acgttagctagcgccaccatgcagatcttctgt
N-presa_etiquetada_R2_EcoRV	ggaccaccaccctccagagc
C-presa_etiquetada_F1	gactacaaagaccatgacgggtgattataaaagatcatgacatcgattacaaggatgacgatgacaa gatgcaqatctctgtgaaaccc
C-presa_etiquetada_R1_XbaI	acgtatctagattagggaatgccttcttattct
C-presa_etiquetada_F2_XbaI	acgtatctagagggtggcggtggtctctggagggtggtgcgactacaaagaacatgacgg
C-presa_etiquetada_F1_EcoRV	gggtggcggtggctctggagg
C-presa_etiquetada_R1_BstBI	acgtattcgaattagggaatgccttcttattctcgg

(continuación)	
Variantes Nub de cebadores de mutagénesis	
NubA_h_F	ccctaccggcaagaccgccacccttgaggtagagcc
NubA_h_R	ggctccacctcaagggtagcggtcttgccggtaaggg
NubV_h_F	ccctaccggcaagaccgtccacccttgaggtagagcc
NubV_h_R	ggctccacctcaagggtagcggtcttgccggtaaggg
NubG_h_F	ccctaccggcaagaccggcacccttgaggtagagcc
NubG_h_R	ggctccacctcaagggtagcggtcttgccggtaaggg
NubA_y_F	acttgaccggtaaaaccgccacattggaagtgaatct
NubA_y_R	agattcaacttccaatgtagcggtttttaccggtaaaagt
NubV_y_F	acttgaccggtaaaaccgccacattggaagtgaatct
NubV_y_R	agattcaacttccaatgtagcggtttttaccggtaaaagt
NubG_y_F	acttgaccggtaaaaccggcaccattggaagtgaatct
NubG_y_R	agattcaacttccaatgtagcggtttttaccggtaaaagt
Generación de informador de cebadores	
generación de 5xGAL4UAS-luciferasa-higroR	
Higro_F	acgtattcgaaatcgagacaaaatggcagattcatc
Higro_R	acgtaggtagccctattctcttgccctcggagc
pFR-Luc_F_SandI	acgtagggaacctggagtagtctctcgcgag
pFR-Luc_R_Sall	acgtagtcgactacaatttgaccttcgcgcc
generación de 8xlexAops-luciferasa-higroR	
lexAops_F_SandI	acgta gggaccc acatatacatataatcttaacctgacig
lexAops_R_BamHI	acgta ggatcc attataacctctagagt atgcattatcatcctcgaagt
generación de 5xGAL4UAS/8xlexAops-GFP-higroR	
GFP_F_BamHI	acgta ggatcc ccgggtaccgagctcgaattccagcttgccattcgcgtactgttggtataa atggctcagcaaggcgaagg
GFP_R_BstBI	acgta ttcgaa ttactgtacagctcgtccatgcgcg

(continuación))

Cebadores de reparación de brecha de cebo para clonar en pCCW-Ste-NotI/Fspl	
Cebadores Gateway, regiones de cebador flanqueantes comunes	
GW_F	ggggacaagtgtgtacaaaaaacaggccta atg del gen
GW_R	ggggaccacttgttacaagaagcgtggga final del gen (reverso)
Generación de clones de entrada, cebadores Gateway	
EGFR_GW_F	ggggacaagtgtgtacaaaaaacaggccta gccacc atgcgacctcogggacgg
EGFR_GW_R	ggggaccacttgttacaagaagcgtggga tgcaccaataaatcactgtcttg
ErbB2_GW_F	ggggacaagtgtgtacaaaaaacaggcctagccacc atggagctggcgcccttg
ErbB2_GW_R	ggggaccacttgttacaagaagcgtgggtacacitggcaogtccagaccc
ErbB3_GW_F	ggggacaagtgtgtacaaaaaacaggcctaagaggggcgaaagcgtct
ErbB3_GW_R	ggggaccacttgttacaagaagcgtgggtaccctgttcatgggcaltga
ErbB4_GW_F	ggggacaagtgtgtacaaaaaacaggcctagccacc atgaagccggcgacaggac
ErbB4_GW_R	ggggaccacttgttacaagaagcgtgggtacaccacagatctccggttcttg
GABBR1_GW_F	ggggacaagtgtgtacaaaaaacaggcctaagggcccgggccct
GABBR1_GW_R	ggggaccacttgttacaagaagcgtgggtacttataaagcaaatgcactcgactcc
GABBR2_GW_F	ggggacaagtgtgtacaaaaaacaggcctaagggccctcaltgcgcctc
GABBR2_GW_R	ggggaccacttgttacaagaagcgtgggtacaggcccgagaccatgactc
TGFbR1_GW_F	ggggacaagtgtgtacaaaaaacaggcctaagggcggtgcgtgc
TGFbR1_GW_R	ggggaccacttgttacaagaagcgtgggtacattttagtcctctctgtgtactga
Mutantes ErbB	
ErbB4-R544W_F	ctctatgatgggaatttgggagtttgagaatgg
ErbB4-R544W_R	ccattctcaaacctcccaaaattccacatcatagag
ERbB4-E872K_F	gactcttggaaggagataaaaaaacagagtagacaatgtctg

(continuación)

Mutantes ErbB	
ErbB4-E872K_R	cagcattgtactcttttttattctctctccaagagtc
ErbB4-E542K_F	glaacctctatgatgtgtaaatctcgaggatttgag
ErbB4-E542K_R	cfcaaacfcccgaaattffaccatcafaagaggttac
EGFR-G719S_F	gafcaaaagfcgagcfcgaggfagctgc
EGFR-G719S_R	gaacgcaccggagctcagcactttgatc
EGFR-T790M_F	gtgcagctcatcatgcagctcatgcc
EGFR-T790M_R	ggcatgagctcatgatgatgagctgcac
ErbB2_1139_A_F	ccagcctgaagctgtgaaccagccag
ErbB2_1139_A_R	ctggctgttcacagcttcaggctgg
EGFR_Y1092A_F	cagtgccgaagccataaaaccagtcg
EGFR_Y1092A_R	cggactgggttaaggcttcaggcactg
EGFR_Y1138A_F	caaccccgagctcacaacacgtc
EGFR_Y1138A_R	gacatgtgagagcctcgggggtg
EGFR_L858R_F	cacagattttggcgggcccaaacfgctggg
EGFR_L858R_R	cccagcagtttggccgccccaaaaatctgtg
EGFR_855D_A_F	gtcaagatcacagcttttgggctggcc
EGFR_855D_A_R	ggccagcccaaaaagctgtgatcttgac
EGFR_ex19del_F	gttaaaattccgfcgctatcaagacatccgaaagccaacaagg
EGFR_ex19del_R	ccctgttgctttcggagatgtctgtgatagcgacgggaattttaac
Cebadores de reparación de brecha de cebo para clonar en pCCW-Ste-NotI/Fspl	
ErbB3-Y1262A_F	gatgaagacatgaagctatgaatcggaacg
ErbB3-Y-1262A_R	cgttcgcgattcatagctcatagctctcatc
ErbB3-Y1199A_F	gatgaggaglatgaagccatgaacccggagg
ErbB3-Y1199A_R	ccctcgggttcagcttcatactctctcatc

(continuación)	
cebadores de mutagénesis b2AR	
b2AR_F	atggggcaaccgggaacgg
GRK6_355,356_F	ctatgggaatggctacgcgcggcaacggcaacacagggg
GRK6_355,356_R	cccdgtgtgcggtgcgcggcgtagccattccatag
GRK2_360_F	ctccagcaacggcaacgcaggggagcagagtgat
GRK2_360_R	atccactdgtccccgtgcgttgcggtgctgggag
GRK6_355,356_GRK2_360_F	cgccggcaacggcaacgcaggggagcagagtgat
GRK6_355,356_GRK2_360_R	atccactdgtccccgtgcgttgcggtgccccggcg
GRK2_364_F	caacgcaggggagcaggggtggatatacacggaac
GRK2_364_F	gttccagtgatataccaccgtgctccccgtgcgttgc
GRK2_396,401	gqcatcaatgtatgccaggcacagctatctgatggc
GRK2_407,411	cagcagtgcgctattgtaccacaattccccctgtgcatcaatg
Cebadores para reparar brecha para poner mutantes b2AR en pCCW-Stc-NotI/Fspl	
GR_1_F	gtccaccttacatctgtgctaaggctaagagggtatggccaccatgggcaacccgggaacg g
GR_1_R	acagcagttatttttctctctgtccacgtgatataccaccgtccccctgcgttgc
GR_2_F	gaatggctacgcgcgcaacgcaggggagcaggtggatatacacgtggaacaggag
GR_2_R	cgcgttaatgcgcgcgtacaggggcgcgccattgcagcagtgctattgtaccac
Cebadores Gateway para clonar mutantes b2AR en clones de entrada	
b2AR-Mutantsg_GW_F	gggggacaagtgtacaaaaaagcaggctta gccaccatggggcaacccgggaacgg
b2AR-Mutants_GW_R	ggggaccactttgtacaagaagcgtgggttacagcagtgagtcattgtactacaattcc
b2AR-Mutants_GW_R+GRK6	ggggaccactttgtacaagaagcgtgggttacagcagtgagtcattgtaccac

Tabla 7 - Lista de anticuerpos

conejo anti-ERK1/2, p44/42 MAPK #45955, Señalización celular
conejo anti-fosfo-ERK1/2, p44/42 MAPK (T202/Y204) #4370S, Señalización celular
ratón anti-GFP, JL-8, Colores vívidos
conejo anti-AKT, #9272, Señalización celular
conejo anti-fosfo-AKT (Ser473) #4058, Señalización celular
conejo anti-EGFR (1005), sc-03, Santa Cruz
conejo anti-fosfo-EGFR (pTyr 1068), LS-C6640, Cubrimiento de vida
conejo anti-VP16 V4388, Sigma
ratón anti-FLAG M2, F3165 Sigma
ratón anti-tubulina sc-8035, Santa Cruz
ratón anti-V5 R960-25, Invitrogen
IqG anti-ratón, enlazado a HRP (oveja) NXA931 GE Healthcare
IgG anti-conejo, enlazado a HRP (burro) NA934V GE Healthcare

- 5 El tema se ha descrito con referencia a realizaciones particulares. Sin embargo, será evidente para los expertos en la materia que son posible realizaciones diferentes de las descritas anteriormente. No obstante, se entenderá que pueden realizarse diversas modificaciones a las realizaciones descritas sin apartarse del alcance de la invención reivindicada. En consecuencia, el alcance de la invención debe determinarse por las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes legales.

10 Referencias

1. Stevens, T.J. & Arkin, I.T. Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins* 39, 417-420 (2000).
- 15 2. Overington, J.P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A.L. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5, 993-996 (2006).
3. Fields, S. & Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246 (1989).
- 20 4. Lievens, S., Lemmens, I. & Tavernier, J. Mammalian two-hybrids come of age. *Trends Biochem Sci* 34, 579-588 (2009).
5. Barrios-Rodiles, M. et al. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 307, 1621-1625 (2005).
- 25 6. Taipale, M., Jarosz, D.F. & Lindquist, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 515-528.
7. Kerppola, T.K. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 449-456 (2006).
- 30 8. Michnick, S.W., Ear, P.H., Manderson, E.N., Remy, I. & Stefan, E. Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nat Rev Drug Discov* 6, 569-582 (2007).
- 35 9. Vidi, P.A. & Watts, V.J. Fluorescent and bioluminescent protein-fragment complementation assays in the study of G protein-coupled receptor oligomerization and signaling. *Mol Pharmacol* 75, 733-739 (2009).
10. Ciruela, F. Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Curr Opin Biotechnol* 19, 338-343 (2008).
- 40 11. Lemmens, I., Lievens, S. & Tavernier, J. MAPPIT: a versatile tool to study cytokine receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 36, 1448-1451 (2008).

12. Johnsson, N. & Varshavsky, A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10340-10344 (1994).
- 5 13. Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. & te Heesen, S. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5187-5192 (1998).
14. Rojo-Niersbach, E., Morley, D., Heck, S. & Lehming, N. A new method for the selection of protein interactions in mammalian cells. *Biochem J* 348 Pt 3, 585-590 (2000).
- 10 15. da Cunha Santos, G., Shepherd, F.A. & Tsao, M.S. EGFR mutations and lung cancer. *Annu Rev Pathol* 6, 49-69.
16. Remy, I. & Michnick, S.W. Application of protein-fragment complementation assays in cell biology. *Biotechniques* 42, 137, 139, 141 passim (2007).
- 15 17. Snider, J. et al. Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nat Protoc* 5, 1281-1293.
18. Ballard, D.W. et al. The 65-kDa subunit of human NF-kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1875-1879 (1992).
- 20 19. Baron, U., Gossen, M. & Bujard, H. Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* 25, 2723-2729 (1997).
- 25 20. Corton, J.C., Moreno, E. & Johnston, S.A. Alterations in the GAL4 DNA-binding domain can affect transcriptional activation independent of DNA binding. *J Biol Chem* 273, 13776-13780 (1998).
21. Emami, K.H. & Carey, M. A synergistic increase in potency of a multimerized VP16 transcriptional activation domain. *Embo J* 11, 5005-5012 (1992).
- 30 22. Ptashne, M. & Gann, A.A. Activators and targets. *Nature* 346, 329-331 (1990).
23. Ruben, S.M., Narayanan, R., Klement, J.F., Chen, C.H. & Rosen, C.A. Functional characterization of the NF-kappa B p65 transcriptional activator and an alternatively spliced derivative. *Mol Cell Biol* 12, 444-454 (1992).
- 35 24. Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. & Ptashne, M. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564 (1988).
25. Schmitz, M.L. et al. Structural and functional analysis of the NF-kappa B p65 C terminus. An acidic and modular transactivation domain with the potential to adopt an alpha-helical conformation. *J Biol Chem* 269, 25613-25620 (1994).
- 40 26. Seipel, K., Georgiev, O. & Schaffner, W. Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. *Embo J* 11, 4961-4968 (1992).
- 45 27. Dunkler, A., Muller, J. & Johnsson, N. Detecting protein-protein interactions with the Split-Ubiquitin sensor. *Methods Mol Biol* 786, 115-130.
28. Johnsson, N. & Varshavsky, A. Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *Embo J* 13, 2686-2698 (1994).
- 50 29. Nijman, S.M. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-786 (2005).
30. Wilkinson, K.D. DUBs at a glance. *J Cell Sci* 122, 2325-2329 (2009).
- 55 31. Rhee, Y., Gurel, F., Gafni, Y., Dingwall, C. & Citovsky, V. A genetic system for detection of protein nuclear import and export. *Nat Biotechnol* 18, 433-437 (2000).
32. Moore, C.A., Milano, S.K. & Benovic, J.L. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69, 451-482 (2007).
- 60 33. Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-137 (2001).
34. Kolch, W. & Pitt, A. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 618-629.
- 65

35. Prickett, T.D. et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet* 41, 1127-1132 (2009).
- 5 36. Pines, G., Kostler, W.J. & Yarden, Y. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett* 584, 2699-2706.
37. Sun, J.M. et al. The different efficacy of gefitinib or erlotinib according to epidermal growth factor receptor exón 19 and exón 21 mutations in Korean non-small cell lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 137, 687-694.
- 10 38. Bublil, E.M. & Yarden, Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol* 19, 124-134 (2007).
39. Favoni, R.E. & Alama, A. Preclinical strategies targeted at non-small-cell lung cancer signalling pathways with striking translational fallout. *Drug Discov Today* 18, 11-24.
- 15 40. Carey, K.D. et al. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res* 66, 8163-8171 (2006).
- 20 41. Schulze, W.X., Deng, L. & Mann, M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 1, 2005 0008 (2005).
42. Jemal, A. et al. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59, 225-249 (2009).
- 25 43. Pawson, T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 38 Suppl 5, S3-10 (2002).
44. Goh, K.I. et al. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8685-8690 (2007).
45. Sriram, G. & Birge, R.B. Emerging roles for crk in human cancer. *Genes Cancer* 1, 1132-1139.
- 30 46. Jan, C.I. et al. Tid1, CHIP and ErbB2 interactions and their prognostic implications for breast cancer patients. *J Pathol* 225, 424-437.
47. Kosaka, T., Yamaki, E., Mogi, A. & Kuwano, H. Mechanisms of resistance to EGFR TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011, 165214.
- 35 48. Zhang, J. et al. Analysis of bypass signaling in EGFR pathway and profiling of bypass genes for predicting response to anticancer EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Mol Biosyst* 8, 2645-2656.
- 40 49. Yang, X. et al. A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs. *Nat Methods* 8, 659-661.
50. Lemerrier, C. et al. mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. *J Biol Chem* 275, 15594-15599 (2000).
- 45 51. Gietz, R.D. & Woods, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96 (2002).

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir cuantitativamente la fuerza y la afinidad de una interacción entre una primera proteína de membrana o parte de la misma y una segunda membrana o proteína soluble o parte de la misma que comprende:

(a) proporcionar una célula de mamífero huésped que incluye un gen detectable (gen informador) que tiene un sitio de unión para un factor de transcripción, de modo que el gen detectable expresa un producto detectable medible cuando el gen detectable se activa transcripcionalmente;

(b) expresar en la célula de mamífero huésped la primera proteína o parte de la misma, uniéndose la primera proteína o parte de la misma a través de un primer enlazador adecuado a un subdominio C-terminal de una ubiquitina humana (Cub) y el factor de transcripción;

(c) expresar en la célula de mamífero huésped la segunda proteína o parte de la misma, estando unida la segunda proteína o parte de la misma a un subdominio N-terminal de tipo salvaje de la proteína ubiquitina humana (Nub) a través de un segundo enlazador adecuado; y

(d) medir una salida de expresión del producto detectable como una medida de la cantidad de interacción entre la primera y la segunda proteínas, en donde el primer enlazador y el segundo enlazador es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos (GGGS)_n, en donde "n" es un número entero igual o mayor que 1, y en donde el gen detectable incluye un gen informador fluorescente y el producto detectable es luciferasa.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la salida de expresión del producto detectable es emisión de luz y la etapa (d) comprende medir la emisión de luz resultante como una medida de la cantidad de interacción entre la primera y la segunda proteína.

3. El método de la reivindicación 2, en donde la etapa (b) comprende introducir en la célula huésped de mamífero como parte de un vector de cebo, un primer gen bajo el control de un promotor, codificando dicho primer gen, entre otras cosas, la primera proteína o parte de la misma cuyo gen está unido a la secuencia de ADN de un primer módulo que codifica, entre otros, el Cub, el primer enlazador adecuado entre la primera proteína y el Cub y el factor de transcripción.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la etapa (c) comprende introducir en la célula huésped de mamífero, como parte de un vector de presa, un segundo gen bajo el control de un promotor, codificando el segundo gen, entre otras cosas, la segunda proteína o parte de la misma cuyo gen está unido a la secuencia de ADN de un segundo módulo que codifica, entre otros, el Nub y el segundo enlazador adecuado entre la segunda proteína y el Nub, y/o en donde el primer y segundo enlazadores adecuados son sustancialmente idénticos, y/o en donde las proteínas primera y segunda o partes de las mismas son proteínas de mamíferos, y/o en donde el vector de cebo se mantiene episómicamente en la célula de mamífero huésped o se integra en el genoma de la célula de mamífero huésped, y/o en donde el vector de presa se mantiene episómicamente en la célula de mamífero huésped o está integrada en el genoma de la célula de mamífero huésped, y/o en donde "n" es un número entero igual o mayor que 2, y/o en donde el factor de transcripción es un factor de transcripción quimérico seleccionado de mLexA-VP16 y Gal4-ratónNFKB.

5. Un kit de reactivos para medir cuantitativamente la resistencia y la afinidad de unión entre una primera proteína de membrana o parte de la misma y una segunda membrana o proteína soluble o parte de la misma que comprende:

(a) una célula huésped que incluye al menos un gen detectable (gen informador) que tiene un sitio de unión para un factor de transcripción, de modo que el gen detectable expresa un producto detectable cuando el gen detectable se activa transcripcionalmente, incluyendo el al menos un gen detectable un gen informador fluorescente y el producto detectable es luciferasa;

(b) un primer vector (cebo) que comprende un primer sitio que puede recibir un primer ácido nucleico que codifica la primera proteína o parte de la misma de manera que cuando se inserta el primer ácido nucleico se une a la secuencia de ADN de un primer módulo que codifica entre otros un subdominio C-terminal de una proteína ubiquitina humana (Cub), un primer enlazador adecuado entre la primera proteína y el Cub, comprendiendo el primer módulo además un ácido nucleico para el factor de transcripción y un promotor, siendo el primer enlazador un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos (GGGS)_n, en donde "n" es un número entero igual o mayor que 1;

(c) un segundo vector (presa) que comprende un segundo sitio que puede recibir un segundo ácido nucleico que codifica la segunda proteína o parte de la misma de manera que cuando se inserta el segundo ácido nucleico se une a la secuencia de ADN de un segundo módulo que codifica entre otros un subdominio N-terminal de tipo salvaje de la proteína ubiquitina humana (Nub) y un segundo enlazador adecuado entre la segunda proteína y el Nub, en donde el segundo módulo comprende además un promotor, siendo el segundo enlazador un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos (GGGS)_n, en donde "n" es un número entero igual o mayor que 1.

6. El kit de la reivindicación 5, en donde el primer y segundo enlazadores adecuados son sustancialmente idénticos, y/o en donde la segunda proteína o parte de la misma es una proteína de membrana, y/o en donde el vector de cebo se mantiene episómicamente en la célula de mamífero huésped o está integrado en el genoma de la célula de mamífero huésped, y/o en donde el vector de presa se mantiene episómicamente en la célula de mamífero huésped o está integrado en el genoma de la célula de mamífero huésped, y/o en donde "n" es un número entero igual a o mayor que 2, y/o en donde el factor de transcripción es un factor de transcripción quimérico seleccionado de mLexA-VP16 y Gal4-ratónNFkB, y/o en donde la primera proteína de membrana o parte de la misma y la segunda membrana o proteína soluble o parte de la misma son proteínas de mamíferos.
7. Un método para identificar un agente potencialmente farmacéuticamente activo que comprende usar el kit de la reivindicación 5 de acuerdo con el método de la reivindicación 4, para detectar la capacidad de un agente de interferir con la interacción proteína-proteína, con lo cual la capacidad de interferir con la interacción proteína-proteína es indicativa de que el agente es potencialmente farmacéuticamente activo.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, para proporcionar un compuesto que puede interferir con la interacción proteína-proteína, en donde la primera y segunda proteínas o partes de las mismas, por lo tanto, se seleccionan de tal manera que se sabe que interactúan cuando se expresan; y en donde el método comprende además (e) incubar la célula huésped de mamífero en presencia y ausencia del compuesto por ensayar; (f) medir la diferencia en la expresión del gen informador entre la incubación que contiene el compuesto por ensayar y la incubación libre del compuesto por ensayar; y opcionalmente (g) purificar o sintetizar el compuesto que puede interferir con la interacción proteína-proteína.
9. Uso de un kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, de acuerdo con el método de la reivindicación 4, en un proceso de criba para identificar fármacos farmacéuticos.
10. Uso de un kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, de acuerdo con el método de la reivindicación 4, en la criba del estado de fosforilación de la primera o segunda proteína.

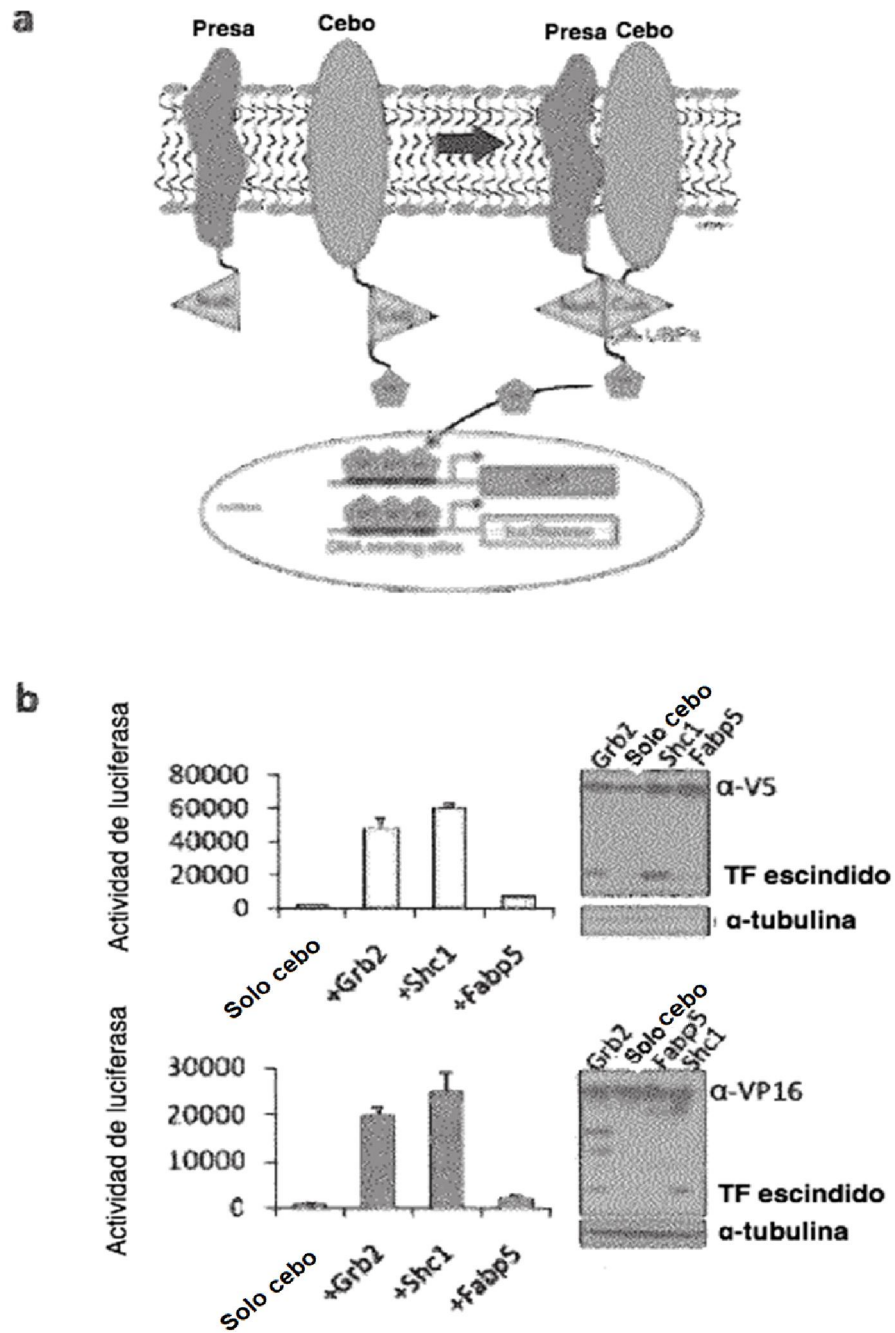


Figura 1

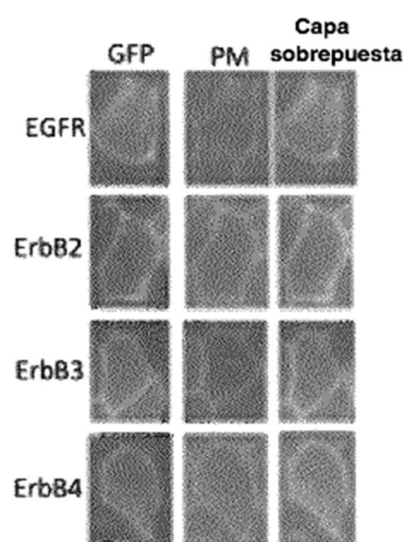
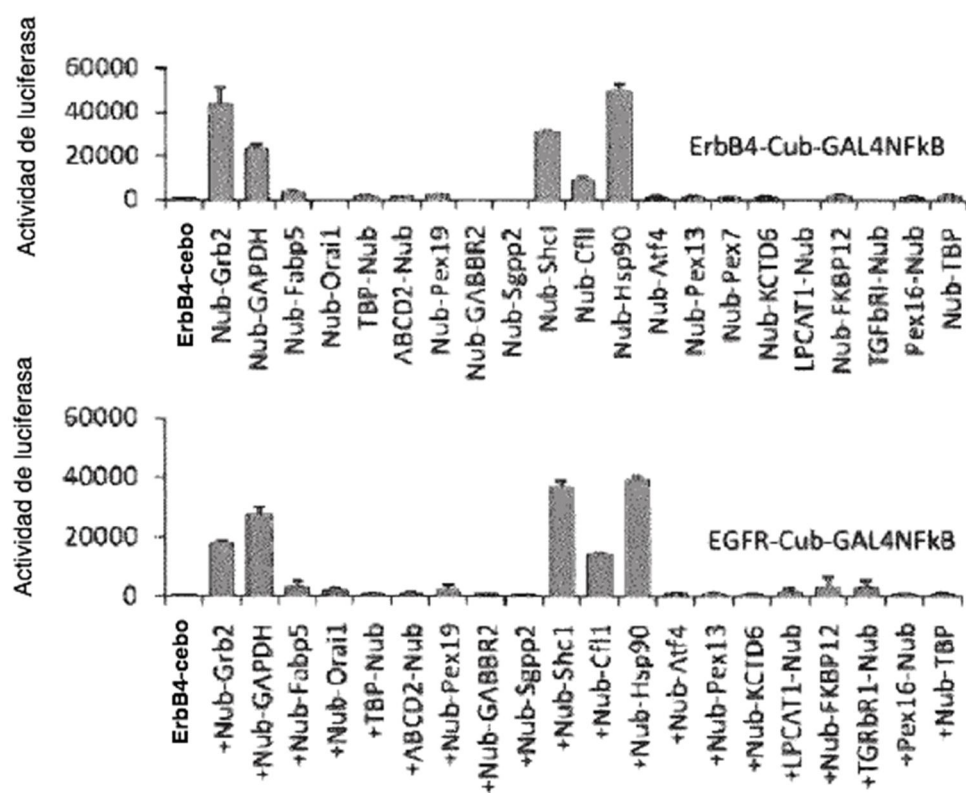
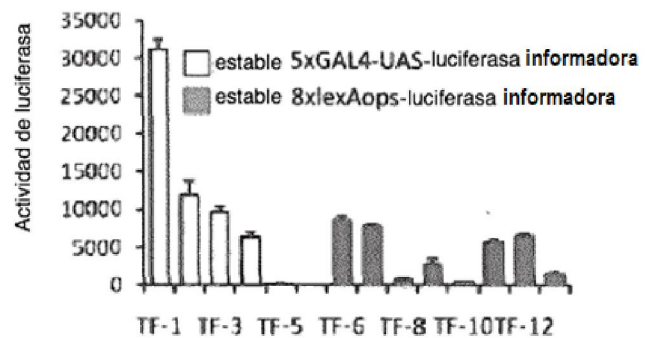
c**d**

Figura 1 continuación

a

	DBD	AD	actividad
TF-1	Gal4 1-147	mNFKB 364-550	100%
TF-2	Gal4 1-147	mNFKB 451-550	38%
TF-3	Gal4 1-147	hNFKB 451-549	31%
TF-4	Gal4 1-147	hNFKB 521-549	0.3%
TF-5	LexA 1-202	VP16 413-490	100%
TF-6	mLexA 1-202	VP16 413-490	81%
TF-7	mLexA 1-202	Gal4	16%
TF-8	mLexA 1-202	mNFKB 364-550	31%
TF-9	mLexA 1-202	hNFKB 451-549	4%
TF-10	mLexA 1-202	VP16- dímero	84%
TF-11	mLexA 1-202	VP16- trímero	75%

b**c**

regiones de enlazador	actividad
enlazador 1 S-S-L-S-I-P-S-T	45%
enlazador 2 (G-G-G-G-S)2	100%
enlazador 3 (G-G-G-G-S)3	97%
enlazador 4 R-S-I-A-T	13%
enlazador 5 R-P-A-C-K-I-P-N-D-L-Q-K-V-M-N-H	68%
enlazador 6 A-A-A-N-S-S-I-D-L-I-S-V-P-V-D-S-R	55%

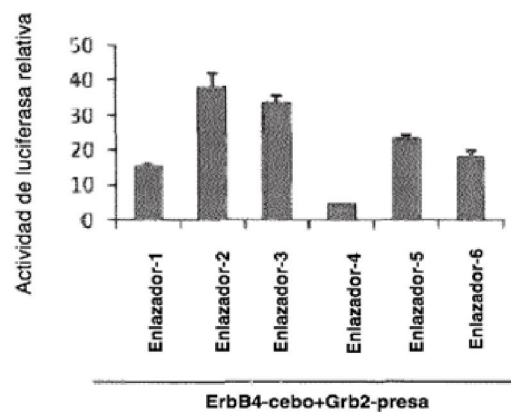
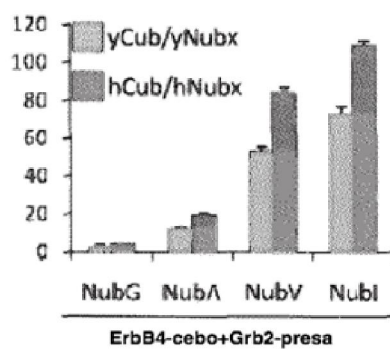
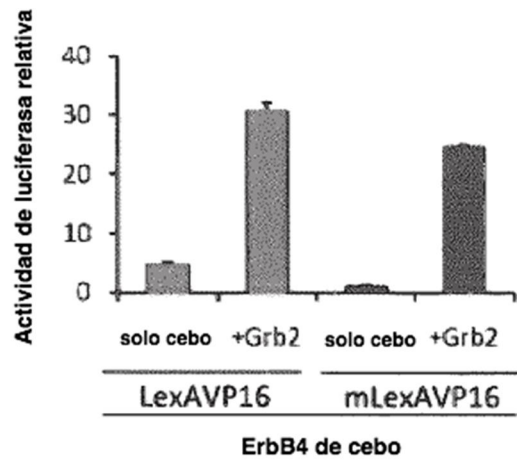
d**e**

Figura 2

f



g

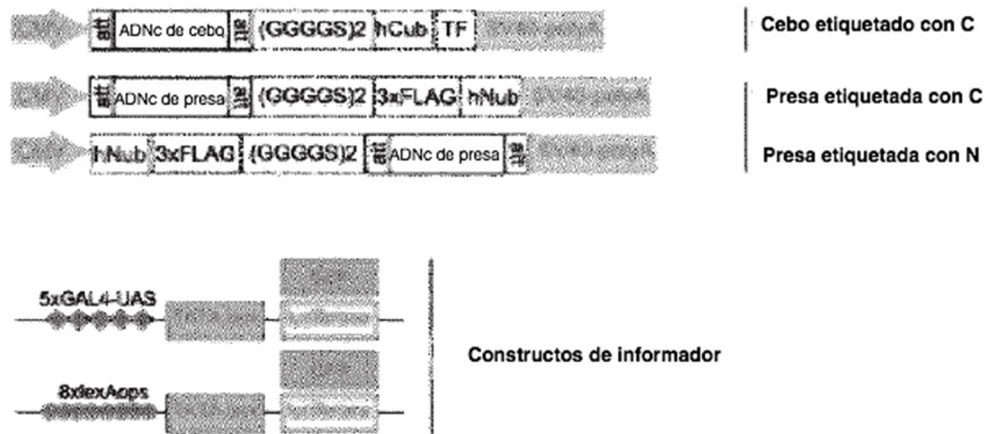


Figura 2 (continuación)

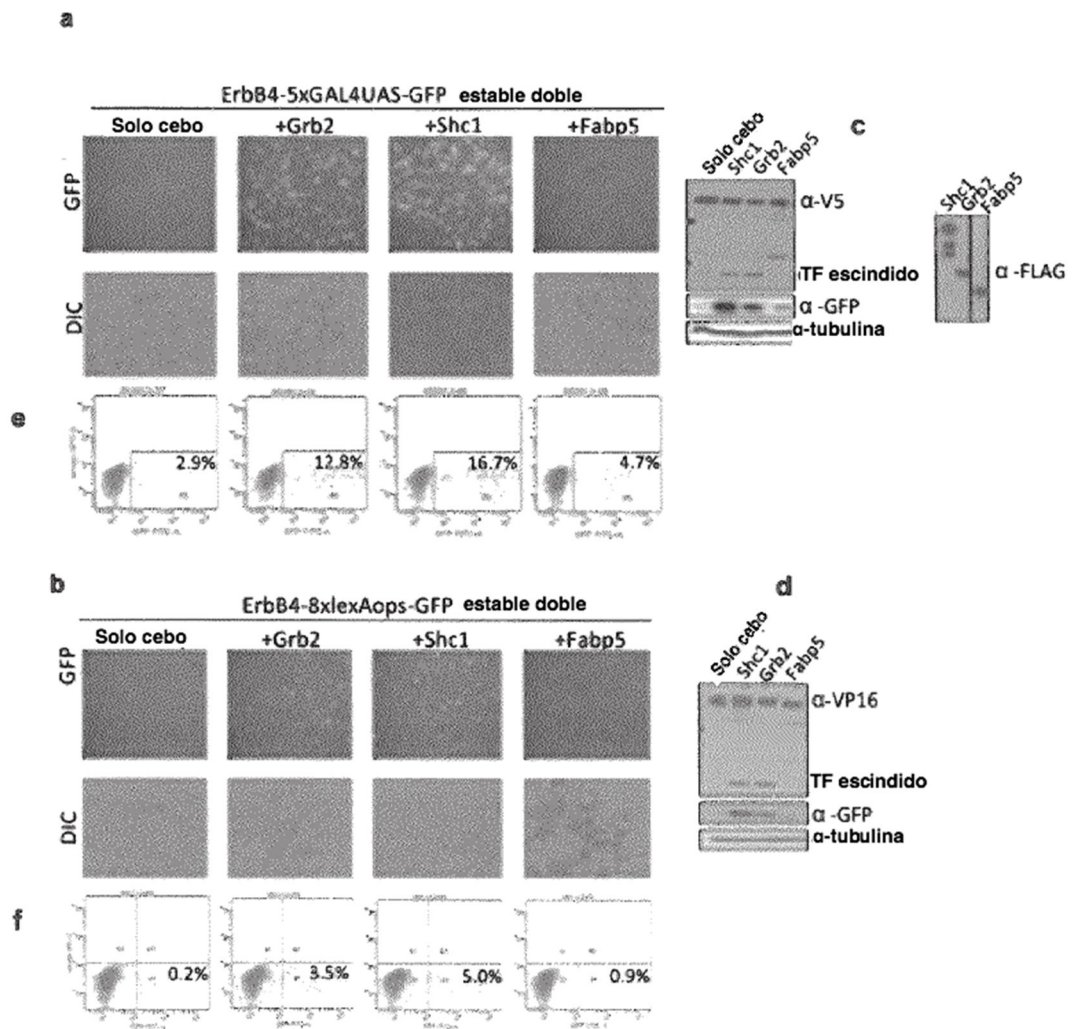


Figura 3

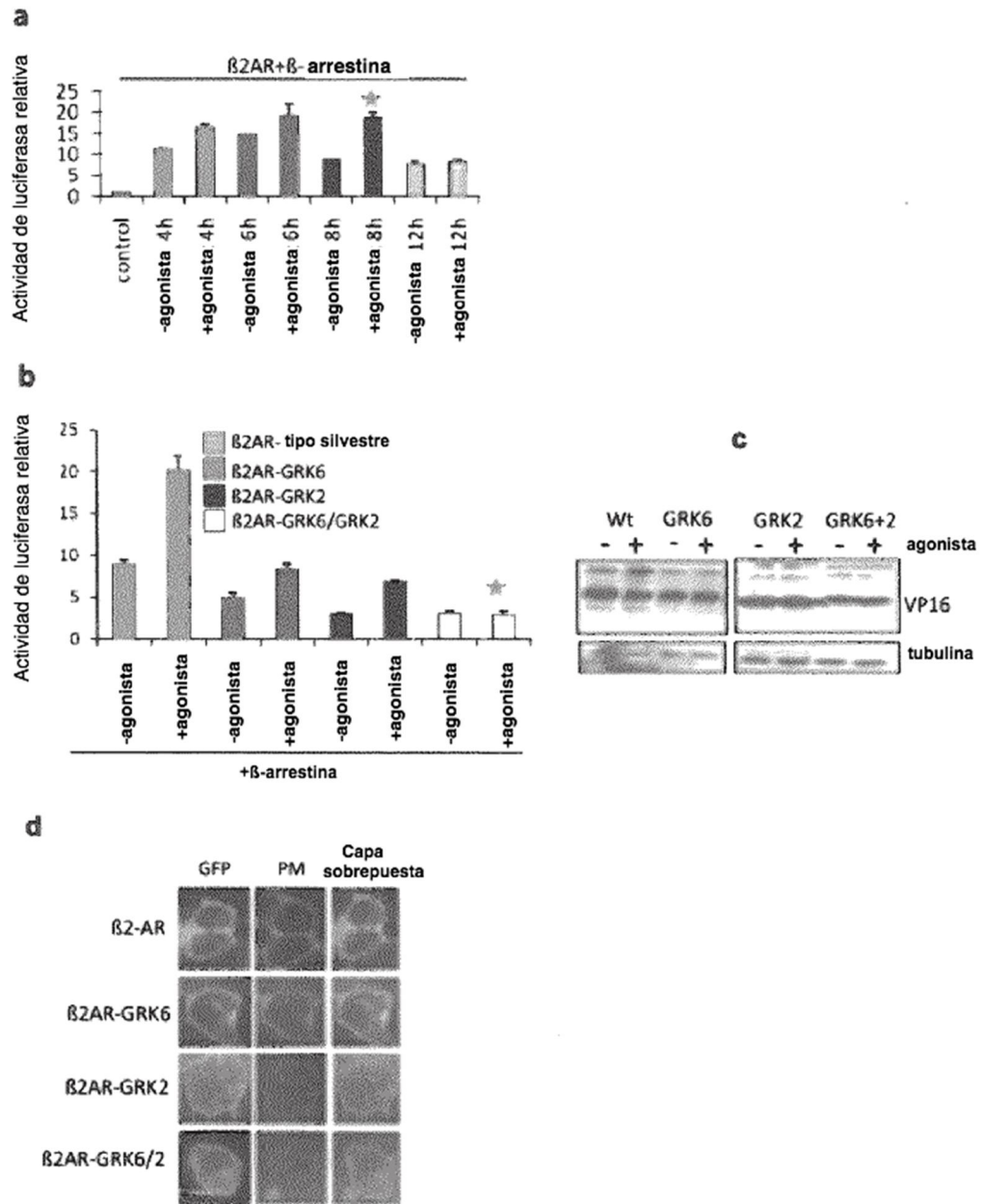


Figura 4

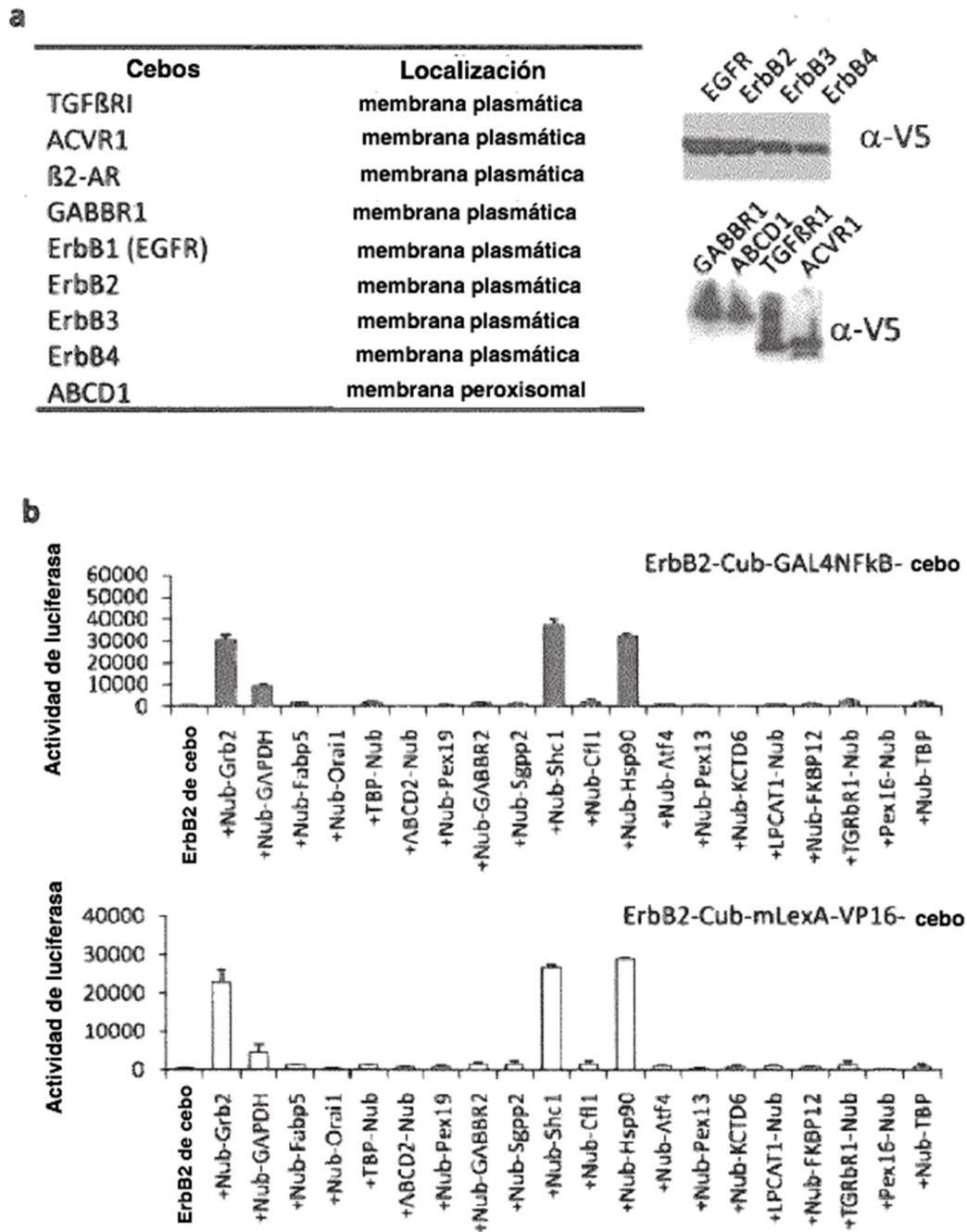


Figura 5

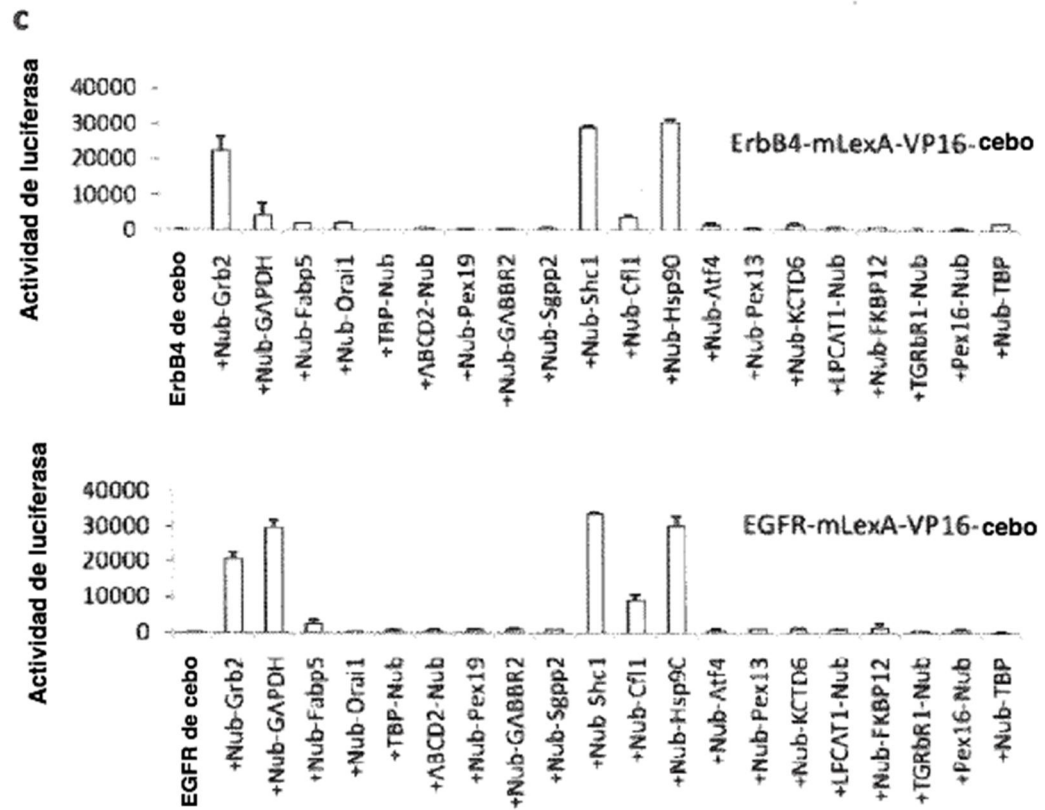


Figura 5 continuación

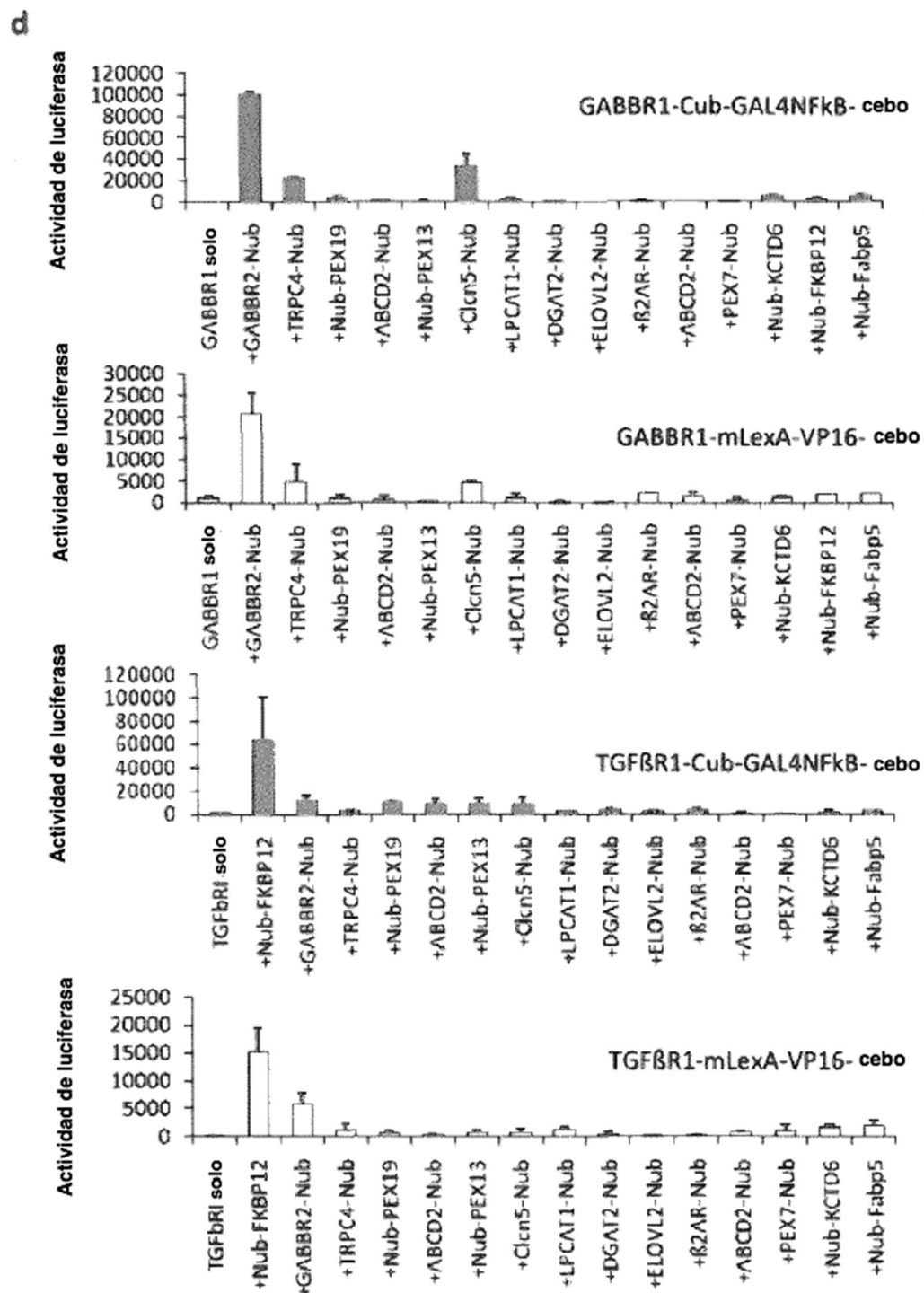


Figura 5 continuación

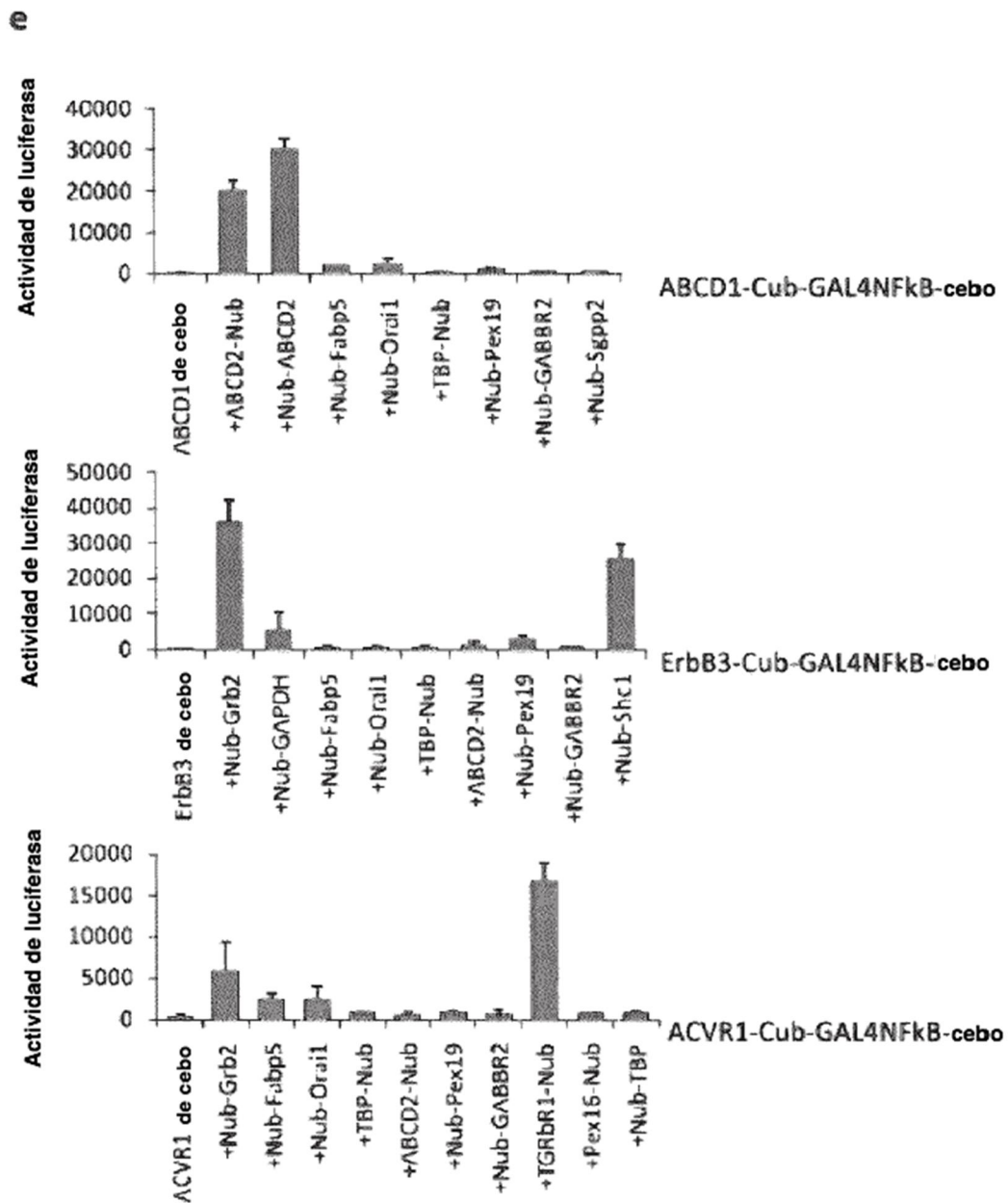


Figura 5 continuación

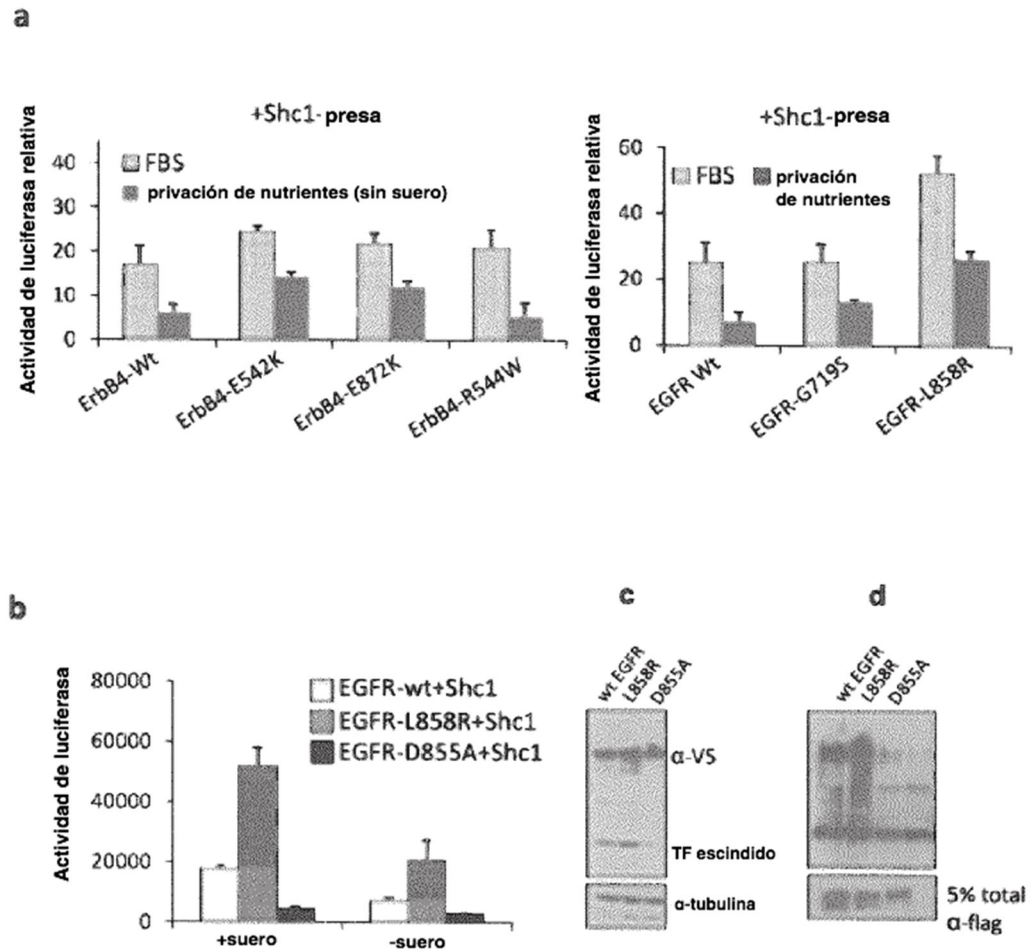


Figura 6

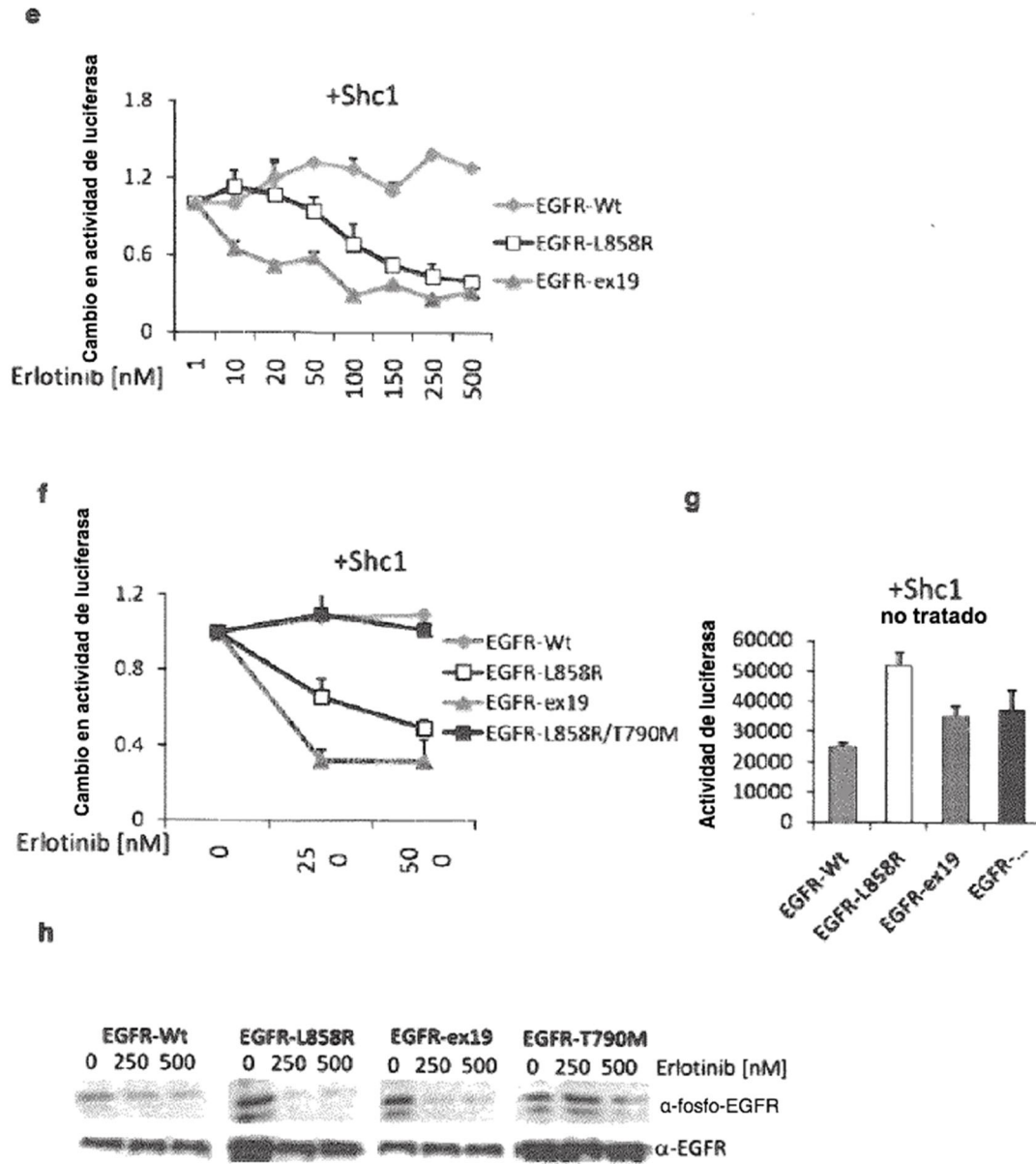
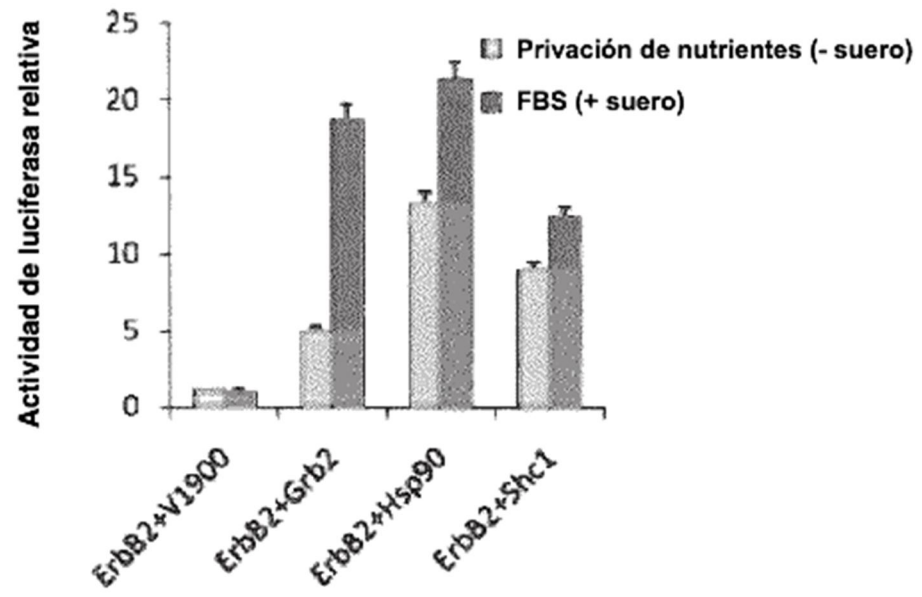


Figura 6 continuación

a



b

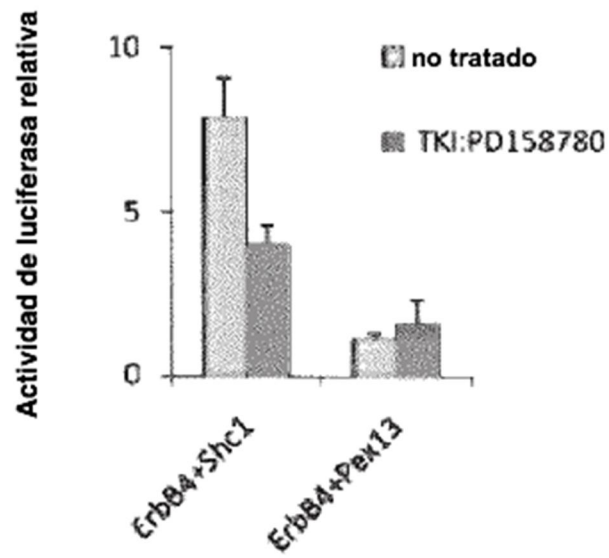


Figura 7

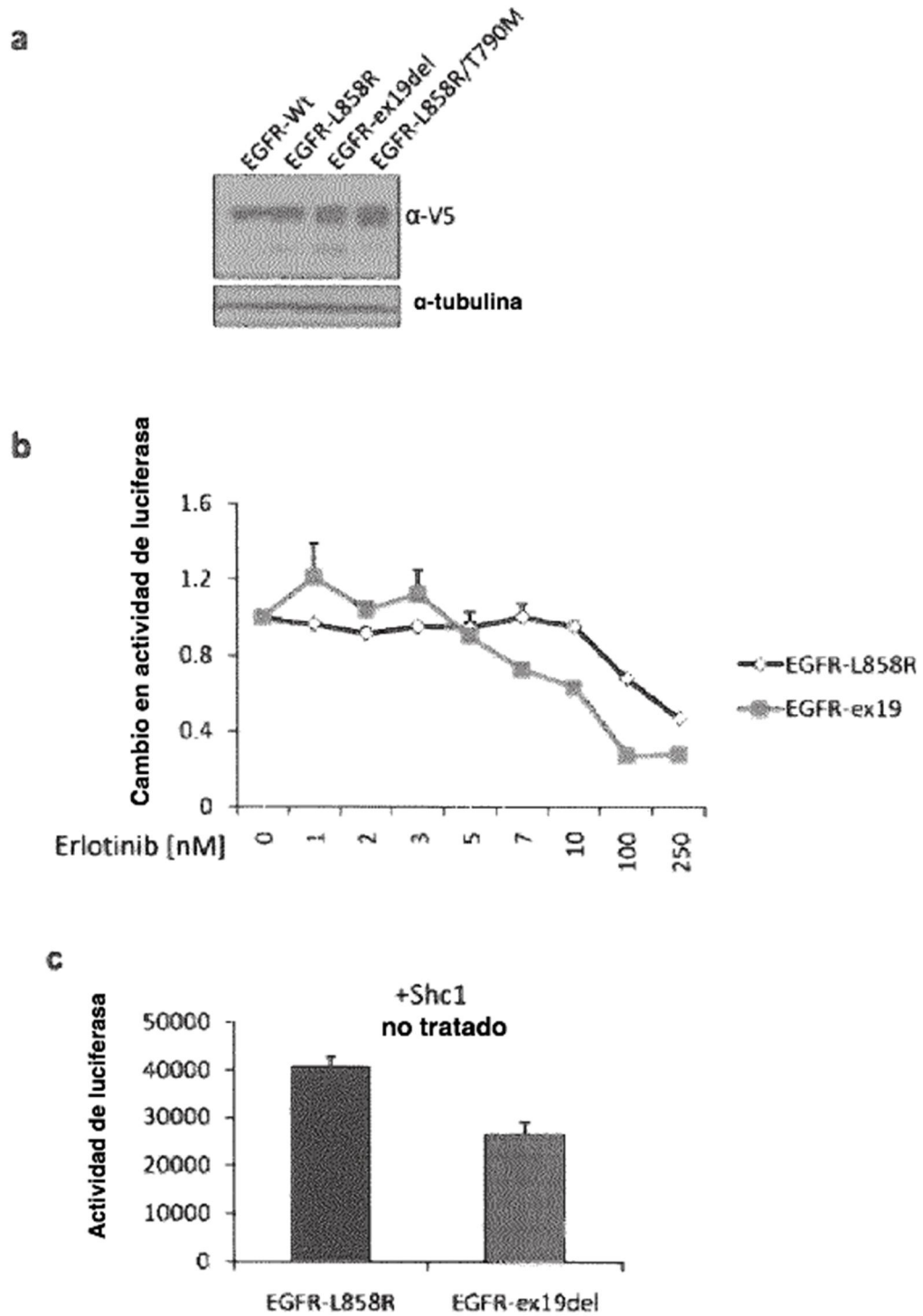


Figura 8

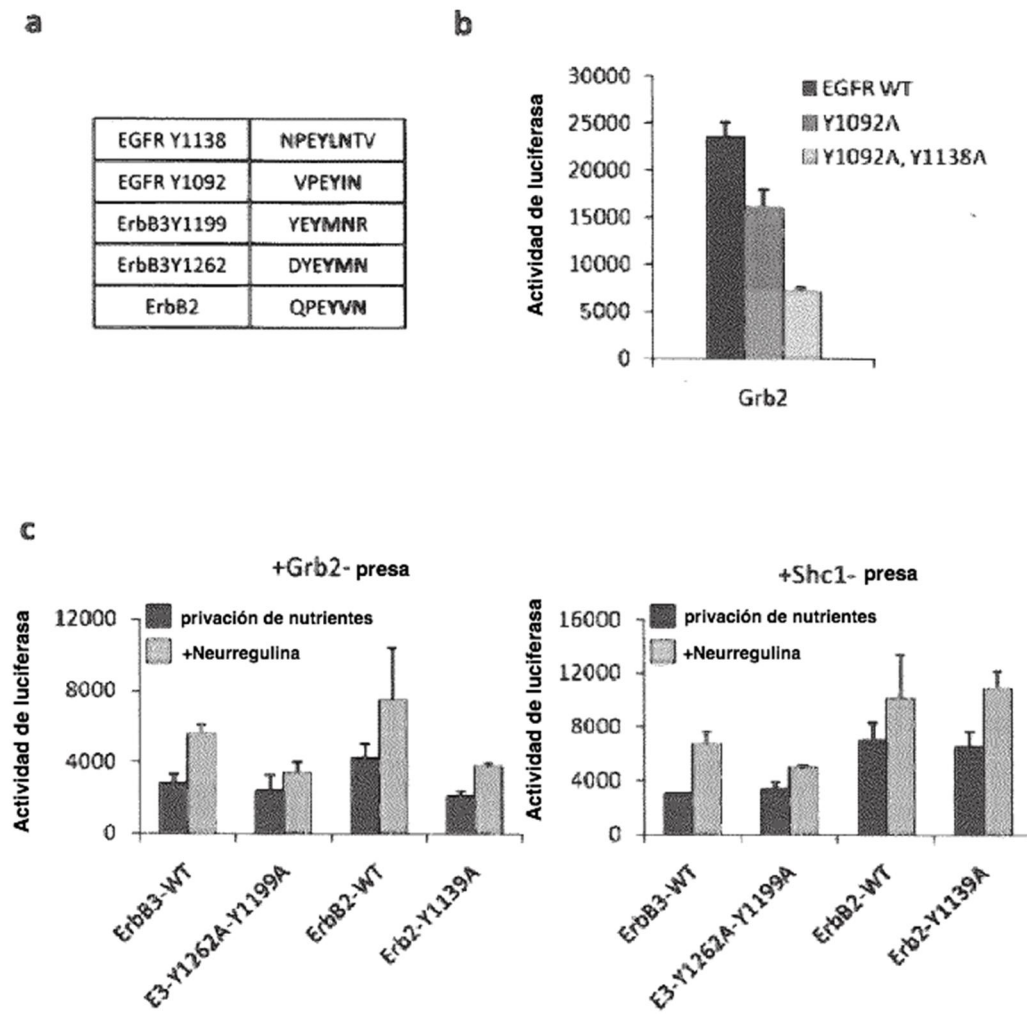


Figura 9

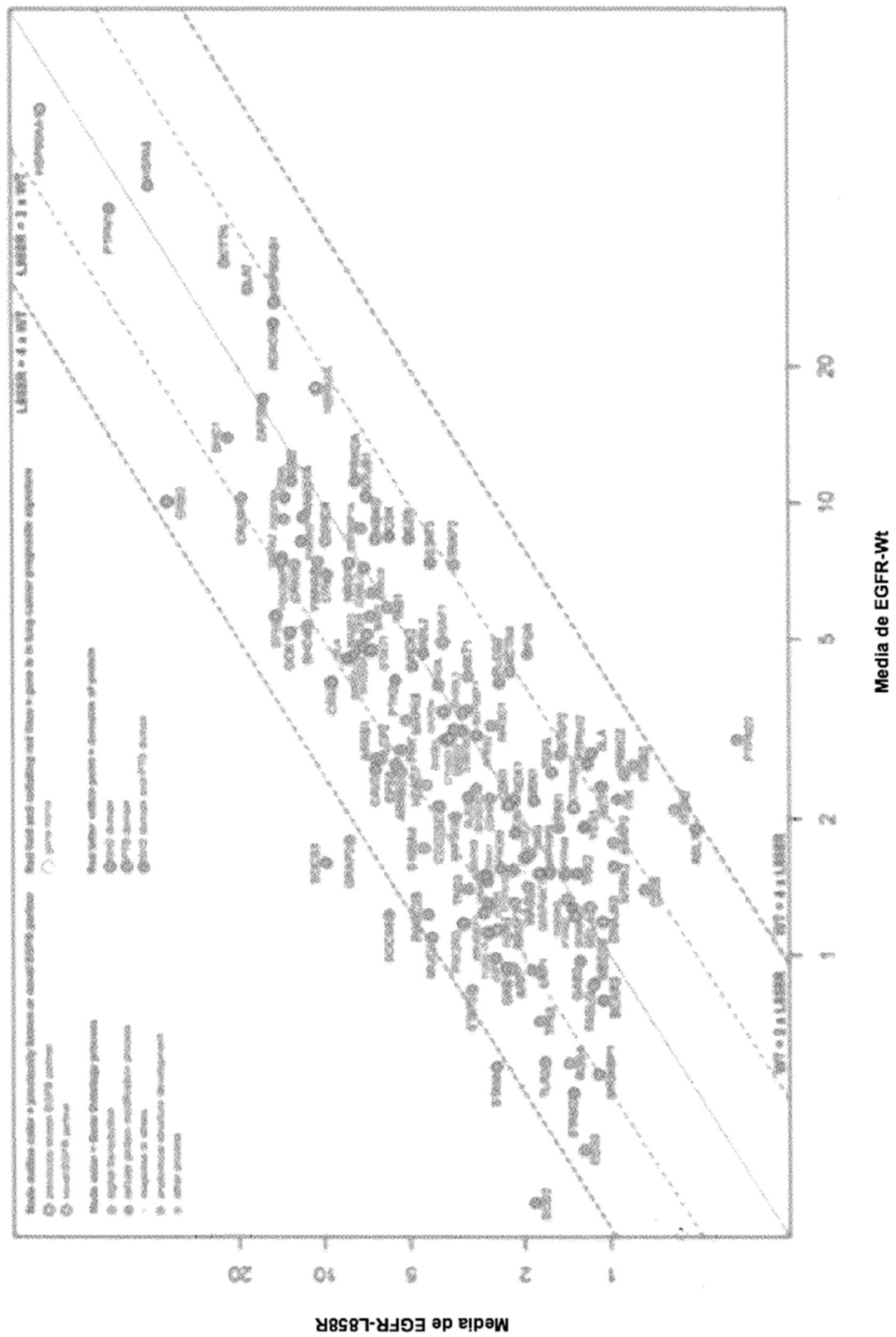
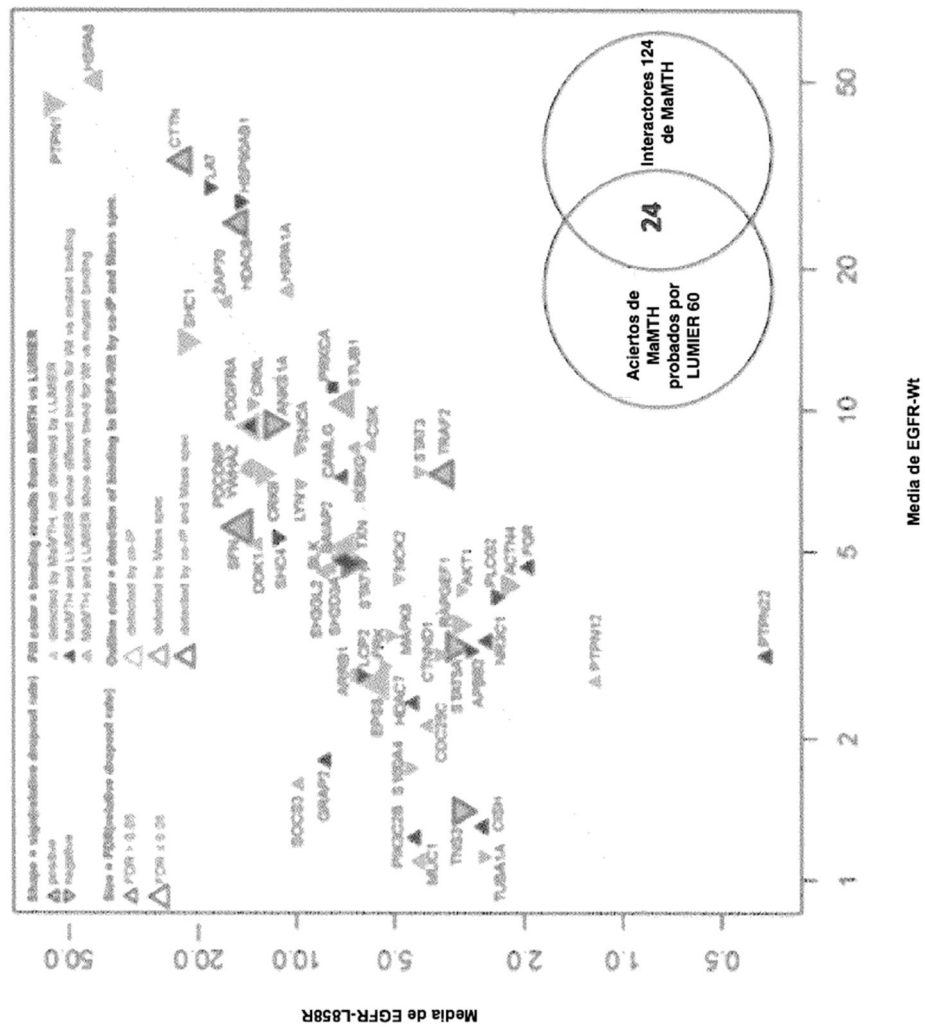


Figura 10



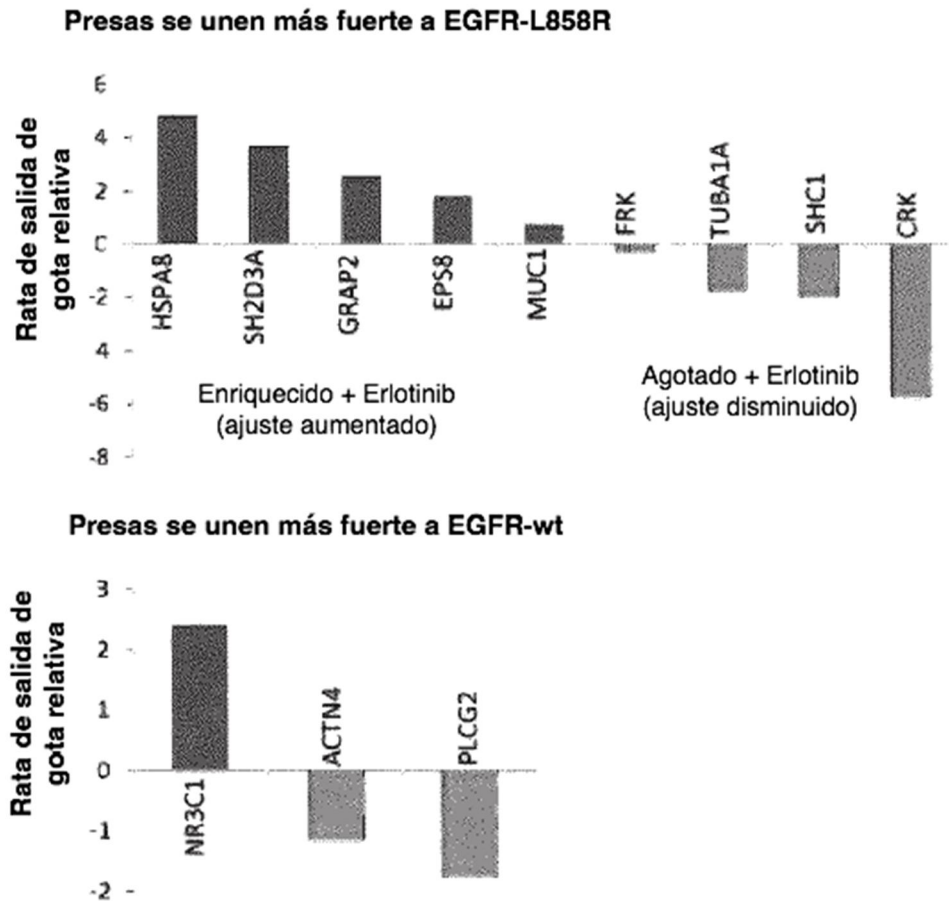


Figura 11 (b)