



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 833**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03763085 .2**
96 Fecha de presentación : **02.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1539956**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **GEF-H1b: biomarcadores, complejos, ensayos y usos terapéuticos de los mismos.**

30 Prioridad: **05.07.2002 US 393600 P**
04.04.2003 US 460053 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2011

73 Titular/es: **SUGEN, Inc.**
235 East 42nd Street
New York, New York 10017, US

72 Inventor/es: **Smeal, Tod, R.;**
Callow, Marinella, G.;
Jallal, Bahija;
Zozulya, Sergey y
Gishizky, Mikhail, L.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 833 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

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al diagnóstico de la proliferación de células anormales en muestras biológicas y al cribado de fármacos que inhiben, reducen o suprimen el crecimiento celular, especialmente crecimiento celular tumorigénico, detectando una isoforma fosfovariante de un novedoso biomarcador del factor de intercambio de guanina-nucleótido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los factores de intercambio de guanina-nucleótido ("GEF") estimulan la disociación del producto fibrolítico de GTP, GDP, de pequeñas proteínas de unión a GTP para promover la unión de una nueva molécula de GTP. Como resultado, este intercambio facilitado por GEF de GDP a GTP está asociado a cambios estructurales en la proteína de unión a GTP que influyen en el grado con el que la proteína de unión a GTP puede interactuar con otras moléculas. Si el GTP está unido, por ejemplo, las proteínas Ras pueden interactuar con efectores y otras moléculas para afectar la proliferación, diferenciación y apoptosis celulares.

15 Está empezando a entenderse la posible importancia de GEF en la localización espacial de cambios en el citoesqueleto de actina. Véase Shamah y col., Cell, 20:105(2):233-44, 2001. Desde una perspectiva evolucionista, este control espacial se satisface porque el Cdc24 de *S. cerevisiae* relativa distante, un GEF para Cdc42, desempeña una función clave en la elección como diana de cambios citoesqueléticos para diferentes dominios espaciales de la célula en respuesta a diferentes señales, O'Shea y col., Nature Cell Biol., 2(3) :E39-41, 2000.

20 Ren y col. (J. Biol. Chem (1998), 273(52), 34954-34960) describen la clonación y la caracterización de GEF-H1. El documento WO 99/63073A desvela la clonación y la caracterización de PAK4. Callow, Marinella G y col. (J. Biol. Chem (2001), 277(1), 550-558) sugieren que la actividad de PAK4 se requiere para el crecimiento independiente de anclaje de líneas de células cancerosas humanas.

25 Por tanto, las técnicas existentes y el conocimiento actual no han usado ni tratado las interacciones de GEF-H1 con otras proteínas como medio por el que pueda controlarse la proliferación celular o desarrollarse la detección y el tratamiento de células y tejidos cancerosos tumorigénicos.

RESUMEN DE LA INVENCION

Por consiguiente, la presente invención prevé un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de GEF-H1b de SEC ID N°: 2, además de un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de SEC ID N°: 1. En este contexto, la invención también contempla un polipéptido de GEF-H1b aislado que comprende la secuencia de SEC ID N°: 2.

30 En otra realización se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el péptido de GEF-H1 de SEC ID N°: 3. La invención también prevé un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de SEC ID N°: 3. En un modo similar, otra realización proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el péptido de GEF-H1 de SEC ID N°: 4. En otra realización también se proporciona un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de SEC ID N°: 4. En una realización preferida se proporciona un polipéptido de GEF-H1 que carece de la región de aminoácidos entre los
35 residuos 162 y 354 de SEC ID N°: 2. En una realización preferida, el GEF-H1 es GEF-H1b. La presente invención prevé formas fosforiladas de uno cualquiera de estos péptidos, polipéptidos y proteínas de GEF-H1. Por tanto, en una realización se proporcionan péptidos que comprenden las secuencias descritas en SEC ID N°: 2, 3 ó 4 que contienen al menos un residuo fosforilado. En una realización preferida, el residuo fosforilado es una serina. En una realización preferida, la serina es serina-67 y/o serina-810 de SEC ID N°: 2. En otra realización, la serina-67 está presente en un
40 péptido de menos de 30 aminoácidos que comprende la secuencia de SEC ID N°: 4. En otra realización, el péptido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 4 tiene menos de 25 aminoácidos de longitud. Preferentemente, este péptido tiene menos de 20 aminoácidos de longitud. En una realización más preferida, el péptido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 4 tiene 18 aminoácidos de longitud.

45 En otra realización, la serina-810 está presente en un péptido de menos de 30 aminoácidos que comprende la secuencia de SEC ID N°: 3. En otra realización, el péptido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 3 tiene menos de 25 aminoácidos de longitud. Preferentemente, este péptido tiene menos de 20 aminoácidos de longitud. En una realización más preferida, el péptido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 3 tiene 18 aminoácidos de longitud.

50 La presente invención también contempla anticuerpos producidos para detectar uno cualquiera de estos péptidos, polipéptidos o proteínas. Por tanto, en una realización se proporciona un anticuerpo específico para GEF-H1 que se produce contra y se une a un péptido que comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 3. En otra realización se proporciona un anticuerpo específico para GEF-H1 que está dirigido contra y se une a un péptido que comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 4. Los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse. Preferentemente, la marca es una marca fluorescente o una marca radiactiva.

- 5 En otra realización, el anticuerpo es una parte de un kit de diagnóstico usado para realizar los procedimientos inventivos descritos en el presente documento. Por tanto, en una realización, el kit incluye un primer recipiente que contiene el anticuerpo y un segundo recipiente que tiene un conjugado de un componente de unión del anticuerpo y una marca tal como, por ejemplo, un radioisótopo. En otra realización, el kit de diagnóstico también puede incluir la notificación de un uso aprobado por la FDA e instrucciones para el mismo.
- En otra realización más se proporciona una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que tiene afinidad de unión específica para un polipéptido de GEF-H1 o un dominio de polipéptido.
- 10 En otra realización más, un anticuerpo específico para GEF-H1 se dirige contra y se une a péptidos de GEF-H1 fosforilado. Por tanto, una realización comprende un péptido que comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 3 que posee una serina fosforilada. Preferentemente, la serina fosforilada en ese péptido es serina-810 de SEC ID N°: 2. En otra realización, el anticuerpo específico para GEF-H1 se dirige contra y se une a un péptido que comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 4 en el que la serina-67 está fosforilada. La numeración de estas serinas en SEC ID N°: 3 y 4 como serina-810 y serina-67 respectivamente indica la numeración de la secuencia de proteínas de longitud completa de GEF-H1, específicamente GEF-H1S de SEC ID N°: 2.
- 15 Otros péptidos descritos en el presente documento incluyen un péptido que comprende al menos uno de SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 20. En otra realización se proporciona un péptido que consiste esencialmente en al menos uno de SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 20. En otra realización más se proporciona un péptido de menos de 30 aminoácidos que comprende la secuencia de SEC ID N°: 6. En otra realización, el péptido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 6 tiene menos de 25 aminoácidos de longitud. Preferentemente, este péptido tiene menos de 20 aminoácidos de longitud.
- 20 En una realización más preferida, el péptido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 6 tiene 18 aminoácidos de longitud.
- En el presente documento también se describe un péptido de menos de 30 aminoácidos que comprende la secuencia de SEC ID N°: 20. En otra realización, el péptido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 20 tiene menos de 25 aminoácidos de longitud. Preferentemente, este péptido tiene menos de 20 aminoácidos de longitud. En una realización más preferida, el péptido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 20 tiene 18 aminoácidos de longitud.
- 25 También se contemplan ácidos nucleicos que codifican proteínas de GEF-H1 de la presente invención. Por tanto, en una realización se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 1. En otra realización se proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido descrito en una cualquiera de SEC ID N°: 2, 3, 4, 6 ó 20. En otra realización más se proporciona una molécula de ácido nucleico que tiene menos de 90 nucleótidos de longitud y que codifica un péptido que comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4. Preferentemente, el polinucleótido tiene menos de 75 nucleótidos de longitud, más preferentemente menos de 60 nucleótidos de longitud y lo más preferentemente 54 nucleótidos de longitud.
- 30 La presente invención también contempla un vector que comprende el polinucleótido que codifica una proteína de GEF-H1b que comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 2. En otra realización, el vector está presente en una célula. En otra realización, el vector comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de SEC ID N°: 3 ó 4. En otra realización, el vector está presente en una célula.
- 35 Otra realización de la invención es una célula que comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1. En otra realización más se proporciona una célula que contiene una proteína que comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 2. En otra realización, la célula es una célula bacteriana, fúngica o de mamífero.
- 40 La presente invención proporciona un complejo de GEF-H1/proteína aislado, en el que una proteína se une a GEF-H1 para formar el complejo. En una realización, la proteína en el complejo es una cinasa activada por p21 ("PAK"). En una realización más preferida, la PAK es PAK4, PAK5 y PAK6 también se describen en el presente documento.
- La presente invención proporciona procedimientos para identificar sustancias tales como compuestos, productos químicos, fármacos, proteínas o ácidos nucleicos que inhiben o modulan la interacción entre proteínas de GEF-H1 y PAK4, o que inhiben o modulan la actividad de cinasa de PAK4. En otra realización, una sustancia identificada modula o inhibe que GEF-H1b se una a PAK4, o modula los niveles de expresión del gen GEF-H1.
- 45 En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento ("procedimiento 1") para detectar la actividad de PAK4 en una muestra. Este procedimiento comprende detectar la presencia o el nivel de GEF-H1b fosforilado en la muestra, en el que la detección de GEF-H1b fosforilado indica que la muestra también contiene al menos una PAK4 activa. En una realización, GEF-H1b comprende la secuencia descrita en una cualquiera de SEC ID N°: 2, 3 ó 4. En otra realización, la PAK4 se detecta en una muestra de células. En otra realización, la muestra es una preparación de proteínas aislada de un lisado celular. En otra realización, las células son células tumorales. En una realización preferida, la célula tumoral está en un mamífero. En otra realización más, el mamífero se selecciona del grupo que está constituido por un ser humano, rata, ratón, perro, conejo, cerdo, oveja, vaca, caballo, gato, primate, cabra o mono. En una realización muy preferida, el mamífero es un ser humano.
- 50
- 55

- 5 En todavía otro aspecto, por la presente invención se proporciona un procedimiento de identificación de una sustancia que modula la interacción entre PAK4 y el polipéptido de GEF-H1b. Este procedimiento comprende (a) exponer el polipéptido de GEF-H1b a una sustancia candidata para formar una mezcla; (b) introducir en la mezcla una enzima PAK4; y luego (c) medir la cantidad de polipéptido de GEF-H1b fosforilado antes y después de exponer el polipéptido de GEF-H1b a la sustancia candidata. En una realización, una disminución o un aumento en la cantidad de polipéptido de GEF-H1b fosforilado después de la exposición a la sustancia candidata indica que la sustancia candidata es una sustancia que modula la interacción entre PAK4 y el polipéptido de GEF-H1b. En una realización preferida, el polipéptido de GEF-H1b comprende la secuencia de una cualquiera de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4.
- 10 En el presente documento también se describe un procedimiento ("procedimiento 2") de identificación de una sustancia que modula la interacción entre PAK4 y el polipéptido de GEF-H1. Este procedimiento comprende (a) exponer PAK4 a una sustancia candidata para formar una mezcla; b) introducir en la mezcla un polipéptido de GEF-H1; y luego (c) medir la cantidad de polipéptido de GEF-H1 fosforilado, en el que una disminución o un aumento en la cantidad de polipéptido de GEF-H1 fosforilado en comparación con un control en el que PAK4 no se expone a la sustancia candidata indica que la sustancia candidata es una sustancia que modula la interacción entre PAK4 y el polipéptido de GEF-H1.
- 15 En una realización preferida, el polipéptido de GEF-H1 comprende la secuencia de una cualquiera de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4.
- 20 En otra realización, la etapa de determinar si GEF-H1 se fosforila en los procedimientos 1 ó 2 se realiza usando un anticuerpo específico para GEF-H1 dirigido contra un péptido que comprende al menos una de serina-810 fosforilada de SEC ID N°: 2 o serina-67 fosforilada de SEC ID N°: 2.
- En una realización preferida, la sustancia candidata produce una disminución en los niveles totales de fosforilación de GEF-H1.
- 25 En otro aspecto, por la presente invención se proporciona un procedimiento ("procedimiento 3") para identificar una sustancia que modula la interacción entre PAK4 y GEF-H1b. Este procedimiento comprende (i) poner en contacto una sustancia candidata con un complejo de GEF-H1/PAK4 y luego (ii) determinar si el compuesto perturba el complejo. En una realización preferida, GEF-H1b comprende la secuencia de SEC ID N°: 2.
- 30 Aún otro procedimiento ("procedimiento 4") descrito en el presente documento se usa para determinar si una sustancia candidata inhibe la actividad de la cinasa PAK4 en un mamífero. Este procedimiento comprende (i) medir en un mamífero el nivel de fosforilación de una proteína de GEF-H1 que comprende la secuencia de SEC ID N°: 2; (ii) exponer el mamífero a una sustancia candidata; y luego (iii) medir en el mamífero el nivel de fosforilación de la proteína de GEF-H1, en el que una disminución en el nivel de fosforilación de la proteína de GEF-H1 en la etapa (iii) con respecto al nivel medido en la etapa (i) indica que la sustancia candidata es un inhibidor de la cinasa PAK4. En otra realización, la detección de proteínas de GEF-H1 fosforilado después de la administración de la sustancia candidata indica que el fármaco puede no inhibir la actividad de la cinasa PAK4. En otra realización, la relación del nivel de fosforilación de GEF-H1 antes de la aplicación de la sustancia candidata con respecto al nivel de la fosforilación de GEF-H1 después de la aplicación de la sustancia candidata también se determina comparando la relación con un nivel de "fondo" de células de fosforilación de GEF-H1 y/o lisados celulares que no se han tratado con la sustancia candidata.
- 35 En una realización preferida, el mamífero es un ser humano, rata, ratón, perro, conejo, cerdo, oveja, vaca, caballo, gato, primate, cabra o mono. En una realización muy preferida, el mamífero es un ser humano.
- 40 La sustancia candidata identificada por uno cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento puede usarse, por ejemplo, para tratar cáncer, reducir la proliferación celular o reducir el crecimiento celular independiente de anclaje. Por tanto, en el presente documento se describe un procedimiento ("procedimiento 5") para tratar cáncer en un mamífero que comprende administrar al mamífero una sustancia identificada por uno de los presentes procedimientos como actividad de GEF-H1 moduladora o inhibidora o interacción de PAK4 y GEF-H1 moduladora o inhibidora.
- 45 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento ("procedimiento 6") para determinar la presencia de PAK4 activada en una muestra de células. Preferentemente, la muestra de células es una muestra de células tumorales. Este procedimiento comprende (i) obtener el lisado celular de una muestra de células; (ii) aislar y/o separar las proteínas de la preparación de lisado celular; y (iii) detectar la presencia de fosfovariantes de GEF-H1. En una realización, la detección de fosfovariantes de GEF-H1 que tienen serina-810 o serina-67 fosforiladas indica que la muestra de células comprende PAK4 activada.
- 50 En una realización preferida, el nivel de fosforilación de GEF-H1 en este y otros procedimientos descritos en el presente documento se determina usando células completas en un ensayo de ELISA usando anticuerpos específicos para GEF-H1.
- 55

- Otro aspecto de la presente invención implica un procedimiento *in vitro* ("procedimiento 7") para detectar la proliferación celular, motilidad celular e/o invasión celular en un mamífero. Este procedimiento comprende monitorizar el nivel de fosforilación de GEF-H1 en al menos dos momentos de tiempo (es decir, momento de tiempo A y al menos otro momento de tiempo B) en una muestra tomada del mamífero, en el que un aumento en el nivel de fosforilación de GEF-H1 en la muestra entre los momentos de tiempo es indicativo de proliferación celular, motilidad celular e/o invasión celular
- 5 En una realización preferida, el GEF-H1 es una proteína de GEF-H1b que comprende la secuencia de SEC ID N°: 2.
- En otra realización más, la muestra del procedimiento 7 se obtiene de piel, sangre o células de mamífero. En una realización, las células son células tumorales.
- 10 En otra realización, el mamífero se selecciona del grupo que está constituido por un ser humano, rata, ratón, perro, conejo, cerdo, oveja, vaca, caballo, gato, primate, cabra o mono. Lo más preferentemente, el mamífero es un ser humano.
- En otro procedimiento ("procedimiento 8") descrito en el presente documento, los péptidos que comprenden la secuencia de SEC ID N°: 3 ó 4 se administran a células o preparaciones de lisado celular para inhibir competitivamente la fosforilación de proteínas de GEF-H1 endógenas. En una realización, estos péptidos se administran en exceso, es decir, a una alta concentración tal que se unan esencialmente a todas las proteínas PAK4. En otra realización se proporcionan péptidos de menos de 30 aminoácidos de longitud que comprenden tanto SEC ID N°: 3 como SEC ID N°: 4. Preferentemente, estos péptidos tienen menos de 25 aminoácidos de longitud, más preferentemente menos de 20 aminoácidos de longitud y lo más preferentemente tienen 18 aminoácidos de longitud.
- 15 Por tanto, en el presente documento también se describe un procedimiento ("procedimiento 9") para tratar cáncer en un individuo que comprende inhibir la actividad de GEF-H1 en el individuo. En una realización preferida, el GEF-H1 es al menos uno de GEF-H1a (GEF-H1M), GEF-H1b (GEF-H1S) o GEF-H1c (GEF-H1U). En una realización muy preferida, el GEF-H1b comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 2.
- En otra realización, la etapa de inhibir la actividad de GEF-H1 comprende inhibir la expresión de un gen endógeno que codifica dicho GEF-H1. En otra realización más, la actividad de GEF-H1 se inhibe en o próxima a una población de células cancerosas presentes en dicho individuo. La expresión de un gen que codifica GEF-H1 puede inhibirse o regularse por disminución por técnicas conocidas en la técnica tales como tecnología de sentido contrario e interferencia de ARN. Por consiguiente, pueden usarse ácidos nucleicos mono o bicatenarios (es decir, ADN o ARN) según tales procedimientos para provocar la perturbación, o para terminar la traducción del transcrito de ARN asociado a un gen GEF-H1, o afectar la transcripción del propio gen GEF-H1.
- 20 En el presente documento también se describe un procedimiento ("procedimiento 10") para reducir la proliferación celular y el crecimiento celular independiente de anclaje en una muestra de células que comprende inhibir la actividad de GEF-H1 en la muestra de células. En una realización, el GEF-H1 es al menos uno de GEF-H1a (GEF-h1M) GEF-H1b (GEF-H1S) o GEF-H1c (GEF-H1U). En otra realización, el GEF-H1 es preferentemente GEF-H1b que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 2.
- 25 En un aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21, pero no otros aminoácidos de PAK del grupo II. En una realización preferida, el polipéptido puede unirse a un factor de intercambio de guanina-nucleótido, con lo que se evita la fosforilación mediada por PAK4 del factor de intercambio de guanina-nucleótido o se reduce el nivel de fosforilación mediada por PAK4 del factor de intercambio de guanina-nucleótido. En otra realización, la unión del "polipéptido de SEC ID N°: 21" a un factor de intercambio de guanina-nucleótido evita o reduce el nivel de fosforilación por cualquiera de la fosforilación mediada por PAK del grupo II del factor de intercambio de guanina-nucleótido a la que está unida el polipéptido. En una realización preferida, el polipéptido puede unirse a los aminoácidos 763-921 de GEF-H1b (GEF-H1S).
- 30 Según la presente invención, un polipéptido puede comprender sólo partes de SEC ID N°: 21 con tal que el polipéptido todavía pueda unirse a isoformas de GEF-H1, y con tal que el polipéptido no comprenda ninguna otra secuencia de aminoácidos de la proteína PAK4 o de cualquier otra isoforma de PAK del grupo II. Por tanto, un polipéptido de la presente invención puede comprender los aminoácidos 276-324 de PAK4 (es decir, SEC ID N°: 21), o los aminoácidos 280-324, o los aminoácidos 285-324, o los aminoácidos 291-324, o los aminoácidos 298-322 (es decir, SEC ID N°: 22).
- 35 Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21, o que consiste esencialmente en una parte de SEC ID N°: 21. Como se usa en el presente documento, la frase "que consiste esencialmente en" excluye otros aminoácidos de proteínas PAK del grupo II, excepto aquellos de SEC ID N°: 21.
- En otra realización, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de

SEC ID N°: 21.

5 Un polinucleótido que codifica SEC ID N°: 21 puede ligarse operativamente a un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína o polipéptido sin relacionar con PAK. Por tanto, la presente invención prevé construcciones de ADN de SEC ID N°: 21 y de SEC ID N°: 22 que expresan proteínas de fusión que comprenden tanto SEC ID N°: 21 como SEC ID N°: 22 o ambas, y al menos otra proteína o polipéptido.

En otra realización más, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido que tiene al menos el 70% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21, y en el que el polipéptido puede unirse a un factor de intercambio de guanina-nucleótido.

10 En el presente documento también se describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22, pero no otros aminoácidos de PAK del grupo II. En una realización preferida, el polipéptido puede unirse a un factor de intercambio de guanina-nucleótido, con lo que se evita o se reduce el nivel de fosforilación mediada por PAK4 del factor de intercambio de guanina-nucleótido. En otra realización, la unión de un "polipéptido de SEC ID N°: 2" tal a un factor de intercambio de guanina-nucleótido evita o reduce cualquier fosforilación mediada por PAK del grupo II del factor de intercambio de guanina-nucleótido a la que está unida el polipéptido.

15 En el presente documento también se describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22, o que consiste esencialmente en una parte de SEC ID N°: 22. Como se usa en el presente documento, la frase "que consiste esencialmente en" excluye otros aminoácidos de proteínas PAK del grupo II, excepto aquellas de SEC ID N°: 22.

20 En el presente documento también se describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22.

En el presente documento también se describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 90% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22, y en el que el polipéptido puede unirse a un factor de intercambio de guanina-nucleótido,

25 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un polipéptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21. En una realización, el polipéptido comprende una marca. En otra realización, la marca se selecciona del grupo que está constituido por biotina, marca His, radiomarca, fluoróforos y cromóforos.

30 En el presente documento se describe un polipéptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22. En una realización, el polipéptido comprende una marca. En una realización preferida, la marca se selecciona del grupo que está constituido por biotina, marca His, radiomarca, fluoróforos y cromóforos.

La presente invención también proporciona un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencias con SEC ID N°: 21, en el que el polipéptido puede unirse a un factor de intercambio de guanina-nucleótido.

35 Además, se proporciona un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 76% de identidad de secuencias con SEC ID N°: 21, en el que el polipéptido puede unirse a un factor de intercambio de guanina-nucleótido.

40 En todavía otro aspecto se proporciona un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 276-324 de la cinasa 4 activada por p21, y al menos otra secuencia de polipéptidos en la que el polipéptido recombinante no comprende la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 1-275 de la cinasa 4 activada por p21 ni la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 325-985 de la cinasa 4 activada por p21. El polipéptido recombinante no comprende ninguna otra secuencia de polipéptidos de PAK del grupo II.

En una realización, el polipéptido comprende una marca. En una realización preferida, la marca se selecciona del grupo que está constituido por biotina, marca His, radiomarca, fluoróforos y cromóforos.

45 Por tanto, cualquiera de los polipéptidos de la presente invención puede marcarse de manera que pueda detectarse, manipularse fácilmente o aislarse de una muestra.

En el presente documento se describe un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencias con SEC ID N°: 22 en el que el polipéptido puede unirse a un factor de intercambio de guanina-nucleótido.

50 En el presente documento se describe un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 298-324

de la cinasa 4 activada por p21, y al menos otra secuencia de polipéptidos en la que el polipéptido recombinante no comprende la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 1-297 de la cinasa 4 activada por p21, ni la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 325-985 de la cinasa 4 activada por p21. El polipéptido recombinante no comprende ninguna otra secuencia de polipéptidos de PAK del grupo II.

5 En el presente documento se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 276-324 de la cinasa 4 activada por p21. En una realización, este polipéptido no comprende la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 1-275 de la cinasa 4 activada por p21, y no comprende la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 325-985 de la cinasa 4 activada por p21. El polipéptido recombinante no comprende ninguna otra secuencia de polipéptidos de PAK del grupo II.

10 En el presente documento se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 298-324 de la cinasa 4 activada por p21. En una realización, el polipéptido no comprende la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 1-297 de la cinasa 4 activada por p21, y no comprende la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 325-985 de la cinasa 4 activada por p21. El polipéptido recombinante no comprende ninguna otra secuencia de polipéptidos de PAK del grupo II.

15 La presente invención también prevé una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que consiste esencialmente en o está constituido por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21, o parte de la misma. En una realización preferida, un polipéptido tal puede unirse a una isoforma de GEF-H1. En el presente documento también se describe una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que consiste esencialmente en o está constituido por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22.

20 En el presente documento se describe un procedimiento para detectar la presencia de un factor de intercambio de guanina-nucleótido en una muestra biológica. El procedimiento comprende:

(i) incubar una muestra biológica con un polipéptido derivado de la cinasa activada por p21, y
25 (ii) determinar si alguno de los polipéptidos derivados de la cinasa activada por p21 está unido a un factor de intercambio de guanina-nucleótido,

en el que (a) el polipéptido derivado de la cinasa activada por p21 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 298-324 de la cinasa 4 activada por p21,

30 (b) el polipéptido derivado de la cinasa activada por p21 no comprende la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 1-297 de la cinasa 4 activada por p21, y

(c) el polipéptido derivado de la cinasa activada por p21 no comprende la secuencia de aminoácidos denotada por los residuos 325-985 de la cinasa 4 activada por p21.

35 En una realización, el polipéptido derivado de la cinasa activada por p21 comprende una marca. En una realización preferida, la marca se selecciona del grupo que está constituido por biotina, marca His, radiomarca, fluoróforos y cromóforos.

40 En otra realización del procedimiento, la etapa de determinar si alguno de los polipéptidos derivados de la cinasa activada por p21 está unido a un factor de intercambio de guanina-nucleótido comprende extraer polipéptido derivado de la cinasa activada por p21 radiomarcado no unido de la muestra biológica, y luego medir el nivel de radiactividad en la muestra.

45 En el presente documento se describe un procedimiento para inhibir la fosforilación mediada por PAK4 de un factor de intercambio de guanina-nucleótido. Este procedimiento comprende exponer un factor de intercambio de guanina-nucleótido a un polipéptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21, en el que el polipéptido se une al factor de intercambio de guanina-nucleótido, inhibiéndose por tanto alguna o toda la fosforilación mediada por PAK4 del factor de intercambio de guanina-nucleótido. Es posible que la fosforilación de GEF-H1 por otras proteínas PAK del grupo II también pueda inhibirse similarmente por este procedimiento.

50 En una realización, el factor de intercambio de guanina-nucleótido está en una muestra biológica tal como en un tejido, células cultivadas o células aisladas. En otra realización, la muestra biológica se obtiene de un mamífero. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano, ratón, rata, cerdo, vaca, conejo, perro, gato, caballo, cabra, primate o mono. En una realización muy preferida, el mamífero es un ser humano.

En otra realización, la etapa de exponer el factor de intercambio de guanina-nucleótido al polipéptido comprende administrar a un mamífero una composición farmacéutica que comprende el polipéptido. En una realización preferida,

la composición farmacéutica que comprende el polipéptido es una cualquiera de un comprimido, aerosol, polvo, líquido, gel, crema, supositorio.

La presente invención también proporciona un procedimiento para identificar una molécula que perturba una interacción entre PAK4 y un factor de intercambio de guanina-nucleótido. Este procedimiento comprende (a) exponer un factor de intercambio de guanina-nucleótido a un polipéptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21, en el que el polipéptido se une al factor de intercambio de guanina-nucleótido para formar un complejo;

(b) añadir una o más moléculas de prueba al complejo; y

(c) determinar si el polipéptido y el factor de intercambio de guanina-nucleótido se disocian el uno del otro después de añadir la(s) molécula(s) de prueba al complejo.

En el presente documento también se describe un procedimiento para inhibir fosforilación mediada por PAK4 de una isoforma de GEF-H1 que comprende introducir en una célula un vector que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 21, en el que el polinucleótido se expresa para producir el polipéptido, y en el que el polipéptido se une a una isoforma de GEF-H1 en la célula, inhibiéndose así la fosforilación de PAK4. En una realización preferida, el vector no codifica ninguna otra secuencias de polipéptidos de PAK del grupo II.

Por "inhibir" se entiende que toda, la mayoría o algo de la actividad de fosforilación normal de una proteína PKA, especialmente la de PAK4, se reduce cuando un polipéptido que contiene GID está unido a una isoforma de GEF-H1. "GID" se define más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Unión directa de GEF-H1 a PAK4. Se prepararon lisados a partir de células 293T que expresan en exceso (a) alelos o subdominios de PAK4 marcados con myc y se incubaron con GST, GST-GEF-H1 (787-921) y GST-similar a Maguin unido a perlas de glutatión (designación de perlas 1,2,3,4) o (b) GFP-GEF-H1 y se incubó con péptidos biotinilados con PAK4 (291-355) y (276-324) ligados a perlas de estreptavidina. Se usó una cantidad equivalente de perlas y lisados en exceso (500 ug). Los eluatos de perlas y los lisados totales se analizaron por SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con myc o antisuero GEF-H1; (c) representa un gen PAK4 que explica esquemáticamente las regiones de PAK4 usadas para identificar el dominio de interacción de GEF-H1 (GID). d, alineamiento del GID definido por la región de unión mínima de PAK4 con PAK5 y PAK6 .

Figura 2: La interacción entre PAK4 y GEF-H1 se produce en células tumorales. (a) Lisados de células tumorales humanas de A549, HCT116 y H1299 se inmunoprecipitaron con perlas de proteína G ligada a sueros preinmunitarios dirigidos contra PAK4, dirigidos contra GEF-H1 y dirigidos contra PAK4. Los eluatos de perlas se analizaron por transferencia Western usando antisuero dirigido contra GEF-H1. (b) Doble inmunofluorescencia de células H 1299 que muestra la colocalización de PAK4 y GEF-H1 (rojo) con la proteína α -COP asociada a cis-golgi (verde) y colocalización parcial con el marcador de trans-Golgi, aglutinina de germen de trigo (azul).

Figura 3: PAK4 fosforila GEF-H1 *in vitro* e *in vivo*. (a) El ensayo de cinasa *in vitro* muestra que GST, GST-GEF-H1 (763-921) y GST-proteína similar a Maguin purificadas están fosforiladas por PAK4. La reacción de autofosforilación de control negativo es la mezcla de reacción sin sustrato. Un gradiente de concentración del sustrato de reacción está indicado por los triángulos; (b) Un consenso de sustrato de PAK4 ponderado se alineó con los aciertos de expresión en fago (encima de la línea discontinua). El asterisco indica el sitio fosfoaceptor. Un péptido de GEF-H1 del extremo amino (debajo de la línea discontinua) con un sitio de fosforilación predicho está marcado con "**"; (c) La fosforilación *in vivo* de GEF-H1 por PAK4 se demuestra en una transferencia Western de lisados cotransfectados que se sondaron con antisueros dirigidos contra HA fosfoespecíficos (panel inferior). La cantidad de GEF-H1 total se detectó con antisuero HA (panel superior).

Figura 4: Efectos morfológicos de alelos de GEF-H1. Las células NIH-3T3 se transfectaron con alelos de GEF-H1 marcados con EGFP; GEF-H1S (I), GEF-H1SS810A (II), GEF-H1S S67A (III), GEF-H1S S67,810A (IV), GEF-H1 Q312M,R313G (V) y el vector EGFP (VI). Se usó la fluorescencia de GFP para detectar la expresión de GEF-H1 (paneles izquierdos) y se usó faloidina fluorescente para monitorizar transposiciones citoesqueléticas (paneles derechos).

Figura 5: PAK4 regula la formación de lamelipodios y la atenuación de fibras de tensión mediante la fosforilación de Ser810. (a) Se transfectaron células NIH-3T3 con alelos de PAK4 y de GEF-H1S y se examinaron por obtención de imágenes de fluorescencia de EGFP para los alelos de GEF-H1, se identificaron construcciones de PAK4 por inmunotinción usando antisuero HA, seguido de conjugado de rodamina fluorescente antirratón para PAK4 y cumarina-faloidina fluorescente para marcar actina. a, PAK4 (I) y los mutantes PAK4 S474E (II) y PAK4 K350,351 A (III) se cotransfectaron con la EGFP de control. b, GEF-H1S se cotransfectó con alelos de PAK4 como para a, (I-III). GEF-H1S S810A, GEF-H1S S67A y GEF-H1S Q312M,R313G junto con PAK4 S474E (IV-VI). Las flechas marcan la inducción de

lamelipodios para células que coexpresan PAK4S474E y GEF-H1S o GEF-H1S S67A. Los asteriscos marcan células con inducción de fibras de tensión. La barra de escala representa 10 μ m.

5 Figura 6: Señalización de PAK4 a través de GEF-H1M para los citoesqueletos de actina y MT. Las células NIH-3T3 se cotransfectaron con GEF-H1 y PAK4. La expresión de GEF-H1 y PAK4 se detectó por obtención de imágenes de fluorescencia de EGFP para el antisuero de GEF-H1 y PAK4 (nº 933), seguido de rodamina fluorescente anticonejo para PAK4. Se usó cumarina-faloidina fluorescente para examinar el citoesqueleto de actina. Se usó anticuerpos dirigido contra β -tubulina seguido de conjugado de azul marino dirigido contra ratón para teñir el citoesqueleto de MT. En (a) Se muestran GEF-H1M junto con PAK4 y el mutante PAK4 S474E. Las flechas marcan los lamelipodios ricos en actina en células que coexpresan GEF-H1M y el mutante PAK4 S474E; (b) Se muestran GEF-H1M junto con el vector y los mutantes PAK4 S474E y PAK4 K350,351 A. Obsérvese la disolución parcial no polarizada del citoesqueleto de MT en presencia del mutante PAK4 S474E. La barra de escala representa 10 μ m.

10 Figura 7: Modelo para la regulación recíproca de Rac y Rho *in vivo*. (a) GEF-H1 en un estado no fosforilado retiene la actividad de Rho constitutiva basal; (b) PAK4 puede regular GEF-H1 mediante la fosforilación conduciendo a la activación y a la inhibición simultánea de Rac de la señalización de Rho constitutiva.

15 Figura 8. Puntuaciones de fosforilación de proteínas y péptidos de GEF-H1. (a) Se usaron fosfoisómeros de péptidos derivados de posibles regiones reguladoras para confirmar sitios de fosforilación. Los residuos impresos en rojo están prefosforilados y bloquean la fosforilación *in vitro*; (b) Se usó una combinación de mutantes de delección y dirigidos a sitio usados para la fosforilación de PAK4 físicamente localizada en la proteína de GEF-H1.

20 Figura 9. Conservación de GEF-H1 con Cdc24. La conservación de residuos con Cdc24 está sombreada en rosa y amarillo. Los sitios de fosforilación de PAK4 están marcados con asteriscos en el consenso ponderado que está alineado con las regiones reguladoras putativas conservadas con Cdc24.

La Figura 10 es un esquema del gen GEF-H1S que ilustra las posiciones de los residuos de serina 67 y 810 fosforilados en relación con dominios clave de la proteína de GEF-H1S; el llamado dominio "DH" y el dominio "PH".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

25 En el documento U.S. 60/393.600, diversas isoformas de GEF-H1 se denotaron "GEF-H1a", "GEF-H1b" y "GEF-H1c". Esas mismas isoformas también se denotan ahora en el presente documento "GEF-H1M", "GEF-H1S" y "GEF-H1U". Por consiguiente, "GEF-H1a" es la misma que "GEF-H1M"; "GEF-H1b" es la misma que "GEF-H1S"; y "GEF-H1c" es la misma que "GEF-H1U".

30 De estas formas de corte y empalme de GEF-H1, GEF-H1S (GEF-H1b) consiste esencialmente en los residuos 1-921 de GEF-H1, y también contiene un "mini-exón" de 7 aminoácido. GEF-H1S (GEF-H1b) no comprende un dominio de dedo de cinc en el extremo N. Por el contrario, la secuencia de aminoácidos de GEF-H1M (GEF-H1a) contiene un dominio de dedo de cinc que participa en la unión a microtúbulos. La secuencia de GEF-H1M (GEF-H1a) es idéntica a la versión de longitud completa de GEF-H1, es decir, los residuos 1-985 descritos en Krendel y col., anteriormente.

35 Por tanto, la presente invención proporciona una novedosa isoforma de GEF, "GEF-H1S (GEF-H1b)", que es un biomarcador de proliferación celular y una diana para cribar fármacos candidatos para tratar cáncer. Los inventores descubrieron que detectando un cierto estado de fosforilación de isoformas de GEF-H1 podría determinarse si una célula es tumorigénica o no o muestra crecimiento celular anormal.

40 GEF-H1 es un factor de intercambio de guanina-nucleótido que pertenece a la "familia Dbl" de factores de intercambio (Ren y col., J. Biol. Chem., 273(52); 34954-60, 1998). Un novedoso gen GEF-H1S (SEC ID N°: 1) descrito en el presente documento comprende 2763 nucleótidos y codifica una proteína (SEC ID N°: 2) de 921 aminoácidos que tiene un peso molecular predicho de aproximadamente 104 kD. Todos los miembros de la familia, incluyendo GEF-H1S (GEF-H1b), tienen en común los dominios "DH" y "PH". Véanse, Chan, y col., Oncogene, 9(4):1057-63, 1994; y Musacchio y col., Trends Biochem. Sci., 18(9):343-8, 1993. Normalmente, la actividad enzimática reside en el dominio DH que facilita el intercambio de GDP por GTP en proteínas que pertenecen a la superfamilia Ras de Rho GTPasas. El dominio DH de GEF-H1S (GEF-H1b) (es decir, SEC ID N°: 2) se localiza dentro de los aminoácidos que residen en las posiciones 162 y 354 de la proteína de GEF-H1S (GEF-H1b). El dominio PH se localiza entre los aminoácidos 396 y 496. La presente invención también se refiere a péptidos de GEF-H1 que no comprenden el dominio DH, pero comprenden uno o más sitios de fosforilación.

50 Como se describe en detalle más adelante, las células que expresan en exceso GEF-H1 son independientes del anclaje y proliferan anormalmente. Además, tales células pueden formar tumores cuando se implantan en ratones sin pelo atímicos. Por consiguiente, puede evitarse o reducirse la incidencia de un fenotipo tal regulando por disminución o inhibiendo la expresión de GEF-H1.

La novedosa proteína de GEF-H1S (GEF-H1b) que tiene la secuencia descrita en SEC ID N°: 2 está asociada a, y

- fosforilada por, la serina/treonina-proteína cinasa cinasa 4 activada por p21 ("PAK4"). Dos regiones en la proteína de GEF-H1S (GEF-H1b) están fosforiladas por PAK4, concretamente la serina-810 y la serina-67. "Serina-810" y "serina-67" se refieren a aminoácidos en las posiciones 810 y 67 de la proteína de GEF-H1S (GEF-H1b), es decir, de SEC ID N°: 2. Sin embargo, otras proteínas de GEF-H1 también comprenden residuos de serina en esas posiciones y dentro del sitio de reconocimiento de la fosforilación general. El "sitio de reconocimiento de la fosforilación" se refiere al corto estiramiento de residuos de aminoácidos en cualquier lado del residuo de serina/treonina fosforilable que es reconocido por una cinasa particular. Por consiguiente, los términos "serina-810" y "serina-67" se refieren a residuos de serina fosforilables en una cualquiera de varias proteínas de GEF-H1. Es imaginable que un residuo de treonina en esas posiciones (es decir, en las posiciones 810 y 67 de SEC ID N°: 2) también estaría fosforilado por una cinasa.
- Por tanto, cualquier péptido de GEF-H1 que comprenda las serinas denotadas (en negrita, subrayadas) en los residuos 807-824, RRRSLPAGDALILSFNPP (SEC ID N°: 3) y en los residuos 55-72, RQSLGSRGRSSLSLAK (SEC ID N°: 4) está fosforilado por PAK4. Otras proteínas de GEF-H1 incluyen GEF-H1M y GEF-H1U. Lo anterior se describe en Ren y col., J. Biol. Chem., 273(52): 34954-60, 1998; y Krendel y col., Nat. Cell Biol., 4(4):294-301, 2002. GEF-H1U se describe en Reddy & Chatterjee, Cancer Res., 49(7): 1763-7, 1989. La presente invención prevé péptidos de menos de 30 aminoácidos de longitud que comprenden tanto SEC ID N°: 3 como SEC ID N°: 4. Preferentemente, estos péptidos tienen menos de 25 aminoácidos de longitud, más preferentemente menos de 20 aminoácidos de longitud y lo más preferentemente tienen 18 aminoácidos de longitud. Por consiguiente, la presente invención también contempla polinucleótidos que codifican péptidos que comprenden la secuencia de tanto SEC ID N°: 3 como 4. Es decir, la presente invención prevé polinucleótidos de menos de 90 nucleótidos de longitud que codifican un péptido que comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4. Preferentemente, el polinucleótido tiene menos de 75 nucleótidos de longitud, más preferentemente menos de 60 nucleótidos de longitud y lo más preferentemente 54 nucleótidos de longitud.
- Por consiguiente, la serina-810 y la serina-67 de estas isoformas de GEF-H1 estarán fosforiladas en presencia de PAK4. Por tanto, mientras que la presente invención contempla la medición de la fosforilación de GEF-H1S (GEF-H1b) como un indicador de la actividad de PAK4, la invención también engloba la fosforilación de isoformas de GEF-H1M (GEF-H1a) y GEF-H1U (GEF-H1c). Por tanto, el nivel de fosforilación "total" de GEF-H1 es indicativo de los estados de fosforilación acumulados de proteínas de GEF-H1 que comprenden una secuencia de péptidos descrita en SEC ID N°: 3 ó 4; es decir, GEF-H1 M, GEF-H1S y GEF-H1U.
- Esta información conduce a la predicción de que una secuencia consenso de fosforilación para GEF-H1 es, desde el extremo N hasta el extremo C, "**RBSZXG**" (SEC ID N°: 6) o "**RBSZXL**", (SEC ID N°: 20), en las que R es arginina, B es un aminoácido básico, S es serina, Z es un aminoácido hidrófobo, X es cualquier aminoácido, G es glicina y L es leucina. En algunos sitios de fosforilación en GEF-H1, el residuo de aminoácido del extremo C es una glicina, mientras que en otros sitios el residuo es una leucina. Por consiguiente, cualquier péptido que comprenda esta estructura de secuencia consenso es posiblemente una diana para la fosforilación por PAK4, y tales péptidos pueden usarse en ensayos según la presente invención. Además, cualquier péptido que consista esencialmente en las secuencias consenso RBSZXG y/o RBSZXL es posiblemente una diana para la fosforilación por PAK4, y tales péptidos pueden usarse en ensayos según la presente invención.
- PAK4 se expresa en exceso en líneas de células tumorales humanas y, junto con otros miembros de la familia PAK de cinasas, participa en la regulación de la morfología y la motilidad celular. Véanse, por ejemplo, Callow y col., J. Biol. Chem., 4:277(1):550-8, 2002; Abo y col., EMB J., 17(22):6527-40, 1998; Gnesutta y col., J. Biol. Chem., 276(17):14414-9, 2001; Qu y col., Mol. Cell Biol., 21 (10):3523-33, 2001; y Dan y col., J. Biol. Chem., 276(34):32115-21, 2001. La proteína "PAK4" denominada en el presente documento también se describe en el documento WO 99/53036 y la patente de EE.UU. n° 6.013.500. Otras enzimas PAK pueden fosforilar proteínas de GEF tales como GEF-H1. Se contempla que PAK5 y PAK6 puedan fosforilar un GEF-H1 que comprende los sitios de fosforilación de SEC ID N°: 3 ó 4. PAK5 se ha descrito por Pandey y col., Oncogene, 21 (24): 3939-48, 2002 y Dan y col., Mol. Cell Biol., 22(2): 567-77, 2002. PAK6 se describe en Yang y col., J. Biol. Chem., 276(18): 15345-53, 2001.
- La expresión en exceso de PAK4 induce polimerización de actina localizada y la formación de filopodios, y por consiguiente, los cambios en el citoesqueleto de actina de la célula pueden atribuirse a la actividad de PAK4. Además, las cinasas PAK participan en el crecimiento celular independiente de anclaje oncogénico activado por Ras y en la regulación de la supervivencia celular. Callow y col., 2002, por ejemplo, demostraron que una PAK4 activada tiene la capacidad de transformar células, pero que la forma inactiva ("sin actividad de cinasa") bloquea la proliferación celular independiente de anclaje dependiente de Ras. En general, las células tumorales no requieren anclaje y pueden crecer en suspensión. La proliferación celular independiente de anclaje es un distintivo de células tumorigénicas. Por consiguiente, PAK4 está fuertemente implicada en tumorigénesis y puede ser particularmente importante para la transformación de Ras.
- Desde ese punto de vista, estudios descritos en el presente documento revelan que GEF-H1 es un sustrato para PAK4, y que está fosforilado por la forma activada de la cinasa. Por consiguiente, detectando el estado de fosforilación de GEF-H1 puede determinarse si PAK4 es activa o inactiva. Por tanto, puede determinarse si una célula o muestra de

tejido está proliferando o mostrando signos de crecimiento o morfología celular anormal. Por tanto, GEF-H1 es un excelente biomarcador de actividad de PAK4 y es extremadamente útil para cribar fármacos y compuestos que pueden bloquear la actividad de PAK4. Por ejemplo, un fármaco que altera el estado de fosforilación de GEF-H1 puede ser uno que actúa directa o indirectamente para inhibir la cinasa PAK4 y así mejorar, reducir o idealmente suprimir la proliferación celular. Por tanto, monitorizando el patrón de fosforilación de GEF-H1 en presencia y ausencia de fármacos candidatos pueden identificarse posibles terapias contra el cáncer.

Un ensayo en este contexto implica (i) obtener el lisado celular de una muestra de prueba; (ii) aislar y/o separar proteínas de la preparación de lisado celular; y (iii) detectar la presencia de fosfovariantes de GEF-H1, es decir, proteínas de GEF-H1 fosforilado con serina-810 y/o serina-67. A este respecto podría determinarse si el nivel de fosforilación de la proteína de GEF-H1 total en el lisado celular de la muestra de prueba es anormal comparando ese nivel con el nivel de fosforilación de la proteína de GEF-H1 total aislada de una muestra de células de control. Una muestra de células de control es una muestra de células que son del mismo tipo de células que la muestra de prueba, pero que se aíslan de un mamífero o de una fuente que es conocida por ser sana, es decir, de células naturales de mamífero. La muestra de células de control puede aislarse del mismo individuo del que se aísla la muestra de células de prueba. El mamífero puede ser un ser humano, rata, ratón, perro, conejo, cerdo, oveja, vaca, caballo, gato, primate, cabra o mono.

Por tanto, se espera que la relación del nivel de fosforilación de GEF-H1 entre las muestras de prueba y de control sea mayor en muestras de prueba que poseen tanto (i) un mayor número de cinasas PAK4 activas como (ii) que poseen enzimas cinasa PAK4 con una tasa más rápida de actividad catalítica. Es probable que las células que participan en la motilidad, proliferación e invasión celular tengan, por ejemplo, mayor actividad de PAK4 y, por tanto, un mayor nivel de fosforilación de GEF-H1 que otros tipos de células inmóviles. A este respecto, células tumorales y células del sistema inmunitario (es decir, macrófagos) son ejemplos de células que participan en la motilidad, proliferación e invasión celular. Ejemplos de células tumorales incluyen aquellas de cánceres de tejidos y cánceres de origen hematopoyético.

Las etapas (iii) del procedimiento explicadas resumidamente en el párrafo precedente pueden lograrse usando anticuerpos específicos para GEF-H1. Por tanto, la presente invención proporciona anticuerpos fosfoespecíficos que eligen como diana la forma fosforilada de GEF-H1.

Para medir el estado de fosforilación de GEF-H1 puede emplearse uno cualquiera de varios protocolos conocidos. Por ejemplo, pueden detectarse anticuerpos fosfoespecíficos que se unen a GEF-H1 o complejos de GEF-H1-PAK como se describen en el Ejemplo 9 más adelante. Un complejo de GEF-H1-PAK se refiere a una interacción física entre la proteína de GEF-H1 y una proteína PKA de forma que las dos proteínas estén unidas entre sí. Las proteínas del complejo pueden o pueden no asociarse la una de la otra durante un periodo de tiempo. Preferentemente, el complejo de GEF-H1-PAK es un complejo de GEF-H1S-PAK4. En este contexto, el GEF-H1S (GEF-H1b) del complejo comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 2.

Alternativamente, la fosforilación puede medirse manipulando una proteína verde fluorescente (GFP) híbrida que va a ligarse a un anticuerpo monocatenario que tiene alta afinidad por tanto las formas fosforiladas como sin fosforilar de péptidos de GEF-H1 representados por SEC ID N°: 3 y 4. Entonces se monitorizaría el grado "extinción de la fluorescencia" usando espectroscopía de fluorescencia como se describe por Deo y Daunert, *Anal. Biochem.*, 289(1): 52-9, 2001. El híbrido de GFP experimenta un cambio conformacional tras la fosforilación del péptido de GEF-H1, produciéndose así un tipo diferente de fluorescencia que es fácilmente e inmediatamente detectada y cuantificada.

En la misma línea, un sustrato de péptidos biotinilados derivado de las formas sin fosforilar de péptidos de GEF-H1 de SEC ID N°: 3 y 4 puede ligarse a GFP. Se espera que la posterior fosforilación por PAK4 produzca la extinción de la fluorescencia como se ha mencionado anteriormente. La biotina permite mediciones colorimétricas y de luminiscencia en las que no puede usarse la fluorescencia. Por ejemplo, debido a que las sustancias que inhiben la actividad de PAK4 también evitan la fosforilación del sustrato, tales como los péptidos de GEF-H1, habrá poco o ningún cambio en la conformación de los péptidos y, por consiguiente, poco o ningún cambio en la fluorescencia de GFP. Sin embargo, una marca de biotina facilita la medición de fosforilación, y la ausencia de la misma, en presencia de sustancias inhibidoras candidatas.

Aún otro procedimiento útil para medir el grado de fosforilación de GEF-H1 es la "transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" (FRET). Véase Sato y col., *Nat. Biotechnol.*, 20(3): 287-94, 2002. Este procedimiento mide la transferencia de restos de fosfato entre el dominio de reconocimiento de la fosforilación de PAK4 y los péptidos del sustrato de GEF-H1 (o derivados) (tales como aquellos de SEC ID N°: 3 y 4) como indicador de la fosforilación.

El ensayo de desplazamiento de gel es aún otra forma en la que puede detectarse la fosforilación de una proteína. Véase Wegener y col., *J. Biol. Chem.*, 259(3): 1834-41, 1984.

La presente invención usa un ensayo de lisado celular basado en bioquímica y un procedimiento radiactivo para monitorizar, registrar y detectar cambios en la fosforilación de la proteína de GEF-H1 total y péptidos derivados de

- 5 GEF-H1 por PAK4. Véanse los Ejemplos 14 y 15 más adelante. En el ensayo celular se usan anticuerpos fosfoespecíficos para GEF-H1 para detectar la presencia de GEF-H1 fosforilado en preparaciones de lisado celular. Los anticuerpos que son específicos para GEF-H1 pueden generarse por una cualquiera de varias técnicas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en conejos. Véase Nims y col., *Lab Anim. Sci.*, 23(3):391-6, 1973. Los anticuerpos pueden producirse contra epítopes que son únicos o específicos para una proteína particular. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos contra el péptido conjugado con KLH CSGDRRRAGPEKRPKSS como se ha demostrado previamente para PAK4. Véase, Hashimura y col., *J. Immunol. Methods*, 55(3):375-87, 1982.
- 10 Similarmente también pueden generarse anticuerpos específicos para GEF-H1 en conejos. Específicamente pueden producirse anticuerpos contra las regiones de GEF-H1 fosforiladas por PAK4; es decir, para regiones de GEF-H1S 807-824 (SEC ID N°: 3) y 55-72 (SEC ID N°: 4). Los anticuerpos también pueden producirse para las versiones modificadas de fosfato de estos péptidos. En un modo tal pueden diseñarse anticuerpos que son específicos para variantes tanto no fosforiladas como fosforiladas de GEF-H1.
- 15 Uniendo un anticuerpo para PAK4 a una superficie, tal como a la superficie de perlas, pueden atraparse proteínas PAK4 presentes en células lisadas. Por consiguiente, cualquier proteína PAK4 presente en el lisado celular se unirá a la superficie o perlas en virtud de su interacción con el anticuerpo unido a la superficie/perla. Además, si GEF-H1 también está presente en la preparación, los complejos de GEF-H1/PAK4 pueden aislarse del mismo modo. Las células pueden ser aquellas de líneas celulares establecidas de linaje conocido. Por ejemplo, pueden prepararse lisados celulares a partir de líneas celulares tumorales y someterse a tratamiento con anticuerpos fosfoespecíficos como se ha descrito anteriormente y en el Ejemplo 14.
- 20 Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, o fragmento de anticuerpo que tiene afinidad de unión específica para un polipéptido de GEF-H1, dominio o fragmento del mismo. "Afinidad de unión específica" significa que el anticuerpo se une a un polipéptido diana con mayor afinidad que se une a otros polipéptidos bajo condiciones específicas. Preferentemente, el anticuerpo se une a un polipéptido de GEF-H1 que comprende la secuencia descrita en una cualquiera de SEC ID N°: 2, 3 ó 4. Más preferentemente, el anticuerpo se une a un polipéptido que comprende la secuencia descrita en SEC ID N°: 3 ó 4. Los anticuerpos para GEF-H1 también pueden unirse a variantes fosforiladas de isoformas de GEF-H1. Por consiguiente, estos anticuerpos se unen a versiones fosforiladas de los péptidos descritos en SEC ID N°: 2, 3 y 4. En un modo tal pueden producirse anticuerpos que se unen a péptidos que comprenden serinas fosforiladas, 810 y 67, de las proteínas de GEF-H1.
- 25 El término "policlonal" se refiere a anticuerpos que son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno o un derivado funcional antigénico de las mismas. Para la producción de anticuerpos policlonales pueden inmunizarse diversos animales huésped mediante inyección con el antígeno. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies de huéspedes.
- 30 Los "anticuerpos monoclonales" son poblaciones sustancialmente homogéneas de anticuerpos para un antígeno particular. Pueden obtenerse por cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia. Véanse Kohler y col., *Nature*, 256:495-497, 1975, y la patente de EE.UU. n° 4.376.110.
- 35 Un anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos monoclonales y policlonales "humanizados". Los anticuerpos humanizados son proteínas recombinantes en las que regiones determinantes de la complementariedad no humanas (normalmente murinas) de un anticuerpo se han transferido de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina no humana (por ejemplo, murina) a un dominio variable humano, seguido de la sustitución de algunos residuos humanos en las regiones estructurales de sus homólogos murinos. Los anticuerpos humanizados según la presente invención son adecuados para uso en procedimientos terapéuticos. Las técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulinas murinas se describen, por ejemplo, por la publicación de Orlandi y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 3833, 1989. Técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se describen, por ejemplo, por Jones y col., *Nature* 321:522, 1986; Riechmann y col., *Nature* 332:323, 1988; Verhoeyen y col., *Science* 239:1534, 1988; Carter y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992; y Singer y col., *J. Immun.* 150:2844 1993.
- 40 El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo, frecuentemente la región hipervariable y porciones de las cadenas pesadas y ligeras de alrededor, que muestra afinidad de unión específica para una molécula particular. Una región hipervariable es una parte de un anticuerpo que se une físicamente a la diana de polipéptido.
- 45 Un fragmento de anticuerpo de la presente invención incluye un "anticuerpo monocatenario", un término usado en esta descripción para denotar un polipéptido lineal que se une a antígeno con especificidad y que comprende regiones variables o hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo. Tales anticuerpos monocatenarios pueden producirse por metodología convencional. Las regiones Vh y Vl del fragmento Fv pueden unirse
- 55

- 5 covalentemente y estabilizarse mediante la inserción de un enlace disulfuro. Véase Glockshuber, y col., Biochemistry 1362, 1990. Alternativamente, las regiones Vh y VI pueden unirse mediante la inserción de un ligador de péptidos. Un gen que codifica las secuencias de Vh, VI y el ligador de péptidos puede construirse y expresarse usando un vector de expresión recombinante. Véase Colcher, y col., J. Nat'l Cancer Inst. 82: 1191, 1990. También pueden construirse secuencias de aminoácidos que comprenden regiones hipervariables de las cadenas de anticuerpos Vh y VI usando enlaces disulfuro o ligadores de péptidos.
- Los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse usando, por ejemplo, marcas fluorescentes o marcas radiactivas.
- 10 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tienen afinidad de unión específica para un GEF-H1 o péptido derivado de la invención pueden usarse en procedimientos para detectar la presencia y/o la cantidad de ese polipéptido en una muestra (i) sondando la muestra con el anticuerpo en condiciones adecuadas para la formación del inmunocomplejo diana-anticuerpo y (ii) detectando la presencia y/o la cantidad del anticuerpo conjugado con el polipéptido deseado. Los kits de diagnóstico para realizar tales procedimientos pueden construirse para incluir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos para la diana, además de un conjugado de un componente de unión de los anticuerpos o los propios anticuerpos.
- 15 Un "péptido derivado" de GEF-H1 es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es parte de la proteína de GEF-H1 completa más grande. Por ejemplo, péptidos que comprenden las secuencias descritas en SEC ID N°: 3 y 4 son "péptidos derivados" de la proteína de GEF-H1.
- 20 Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con afinidad de unión específica para un polipéptido de GEF-H1 o PAK4 de la invención puede aislarse, enriquecerse o purificarse a partir de un organismo procarionta o eucariota. Los procedimientos rutinarios conocidos para aquellos expertos en la materia permiten la producción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en organismos tanto procariontas como eucariotas. Anteriormente se ha descrito la purificación, el enriquecimiento y el aislamiento de anticuerpos, que son moléculas de polipéptidos.
- 25 Los anticuerpos que tienen afinidad de unión específica para un polipéptido diana de la invención pueden usarse en procedimientos para detectar la presencia y/o la cantidad de polipéptido diana en una muestra poniendo en contacto la muestra con el anticuerpo en condiciones tales que se forme un inmunocomplejo y detectar la presencia y/o la cantidad del anticuerpo conjugado con el polipéptido diana. Los kits de diagnóstico para realizar tales procedimientos pueden construirse para incluir un primer recipiente que contiene el anticuerpo y un segundo recipiente que tiene un conjugado de un componente de unión del anticuerpo y una marca tal como, por ejemplo, un radioisótopo. El kit de diagnóstico también puede incluir notificación de un uso aprobado por la FDA e instrucciones para el mismo.
- 30 En otro aspecto, la invención muestra un hibridoma que produce un anticuerpo que tiene afinidad de unión específica para un polipéptido de GEF-H1 o un dominio de polipéptido, en el que el polipéptido se selecciona del grupo que tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 2. Por "hibridoma" se indica una línea celular inmortalizada que puede secretar un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo para GEF-H1. En realizaciones preferidas, el anticuerpo para GEF-H1 comprende una secuencia de aminoácidos que puede unirse específicamente a un polipéptido de GEF-H1 de la invención.
- 35 En otro aspecto, la presente invención también se refiere a kits que comprenden anticuerpos que se unen a un polipéptido codificado por cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente, y un anticuerpo de control negativo.
- 40 El término "anticuerpo de control negativo" se refiere a un anticuerpo derivado de una fuente similar a la del anticuerpo que tiene afinidad de unión específica, pero en el que no muestra afinidad de unión para un polipéptido de la invención.
- Por tanto, pueden prepararse análisis de transferencia Western de complejos de GEF-H1/PAK4 aislados y luego sondarse con los anticuerpos para GEF-H1 fosfoespecíficos anteriormente mencionados para determinar el estado de fosforilación de aquellas proteínas. Alternativamente, el lisado celular puede someterse directamente a una transferencia Western y los anticuerpos específicos para GEF-H1 aplicarse sin separación previa de un complejo de GEF-H1/PAK4 específico.
- 45 En cualquier caso, la identificación de un GEF-H1 fosforilado en una muestra de células puede lograrse fácilmente y rutinariamente según la estrategia anteriormente descrita.
- 50 Una muestra celular también puede tratarse con una sustancia candidata tal como un fármaco, producto químico, compuesto, proteína o ácido nucleico para determinar los efectos de esa sustancia sobre la actividad de PAK4 monitorizando los efectos en la dirección 3' sobre la fosforilación de GEF-H1. Una sustancia candidata puede "modular" la actividad de PAK4, o la interacción entre PAK4 y GEF-H1. Por "modular" se indica que la sustancia candidata puede afectar la actividad de cinasa de PAK4 o el grado al que interactúan PAK4 y GEF-H1. Por consiguiente, un efecto de la "modulación" por una sustancia candidata es disminuir el nivel de fosforilación de la proteína de GEF-H1 total en una

muestra dada. También es imaginable que la sustancia candidata aumente la actividad de la cinasa PAK4 o facilite la interacción de GEF-H1/PAK4. En cambio, el nivel de fosforilación de la proteína de GEF-H1 total puede entonces aumentarse después de la exposición a la sustancia. Por tanto, una sustancia candidata puede modular PAK4, GEF-H1 o un complejo de GEF-H1/PAK4 de forma que su(s) efecto(s) establezcan una correlación con el patrón de fosforilación de la proteína de GEF-H1.

En ensayos para cribar sustancias que modulan la actividad de PAK4 o la interacción de GEF-H1/PAK4 puede usarse la secuencia de la proteína de GEF-H1S de longitud completa como se representa en SEC ID N°: 2, o un fragmento más corto tal como los péptidos que están fosforilados por PAK4 (es decir, aquellos representados por SEC ID N°: 3 y 4). Alternativamente, también puede usarse un polipéptido de GEF-H1 que no comprende el dominio DH catalítico para cribar sustancias que modulan la actividad de PAK4 y/o interacción de GEF-H1/PAK4. Por consiguiente, la presente invención contempla un polipéptido de GEF-H1 que carece de la región de aminoácidos entre los residuos 162 y 354.

Un ensayo de cribado de fármacos en este contexto implica (i) obtener un lisado celular, preferentemente de una línea celular tumorigénica; (ii) aplicar al lisado una sustancia candidata ; (iii) aislar y/o separar proteínas de la preparación de lisado celular; y (iv) detectar la presencia de fosfovariantes de GEF-H1. Comparando el nivel de fosforilación de proteínas de GEF-H1 totales antes y después de aplicar la sustancia candidata a una célula o al lisado celular es posible determinar el efecto de la sustancia candidata sobre la actividad de PAK4. Por tanto, se espera que el nivel de fosforilación de la proteína de GEF-H1 total en una relación tal caiga si la sustancia candidata es eficaz en inhibir la actividad de la cinasa PAK4. Además, esta relación (nivel de fosforilación de GEF-H1 antes de la aplicación de la sustancia candidata con respecto al nivel de fosforilación de GEF-H1 después de la aplicación de la sustancia candidata) también puede compararse con un nivel de “fondo” de fosforilación de GEF-H1 en células y/o lisados celulares que no se han tratado con la sustancia candidata. La sustancia candidata puede aplicarse antes de lisar las células.

Una sustancia candidata puede ser péptidos que comprenden las secuencias de GEF-H1 de SEC ID N°: 3 y 4. Por consiguiente, cuando se aplican células a altas concentraciones, es decir, superiores a la cantidad de GEF-H1 endógeno, los péptidos de GEF-H1 deberán competir y unirse a la PAK4 endógena, inhibiéndose así la unión y la fosforilación de GEF-H1 endógeno. El experto sabría cuánto añadir de un inhibidor de péptidos competitivos con el fin de que el péptido se añada a células o lisados celulares “en exceso”. La sustancia candidata también puede ser un ácido nucleico que modula o inhibe la expresión de PAK4. Por tanto, pueden usarse polinucleótidos de sentido contrario o moléculas de ARN bicatenario según técnicas antisentido y de interferencia de ARN para inactivar o regular por disminución la expresión génica de PAK4.

Una sustancia candidata satisfactoria es una que inhibe PAK4 y, como resultado, alivia las anomalías celulares asociadas a la expresión en exceso de PAK4. Por consiguiente, una sustancia candidata satisfactoria es una que retarda o inhibe la proliferación celular, tal como la que se observa en tejidos cancerosos.

Por tanto, sustancias que ejercen tales efectos moduladores o inhibidores son útiles en la modulación o inhibición de células que (i) proliferan, (ii) poseen crecimiento independiente de anclaje o (iii) son móviles. Por consiguiente, administrando una o más de estas sustancias a células que presentan estas propiedades puede inhibirse la proliferación, crecimiento independiente de anclaje o motilidad celular asociados a una muestra de células particular. Por tanto, es posible tratar un individuo que tiene poblaciones de estos tipos de células administrando una o más de las sustancias identificadas en formas puras o farmacéuticamente formuladas. Según tales fundamentos es posible según la presente invención tratar un individuo que tiene cáncer o crecimiento celular tumorigénico administrando una composición farmacéutica que comprende la sustancia identificada que modula o inhibe uno o más fenotipos de células asociados a tejidos o células cancerosas.

La presente invención también hace uso de las siguientes secuencias de aminoácidos de PAK4 como polipéptidos derivados de la cinasa activada por p21 que funcionan del modo recomendado a continuación.

SEC ID N°: 21:

276-CTPAAPAVPGPPGPRSPQREPQRVSHEQFRAALQLVVDPGDPRS YLDNF-324

SEC ID N°: 22:

298-RVSHEQFRAALQLVVDPGDPRS YLD-322

Por tanto, la presente invención engloba un polipéptido derivado de la cinasa activada por p21 del grupo II que puede unirse a una isoforma de la proteína de GEF-H1. Es posible que uniéndose a la proteína de GEF-H1 tales polipéptidos puedan prevenir o impedir el acoplamiento o la unión de longitud completa, por ejemplo, de PAK4 endógena y otros miembros de la familia PAK del grupo II a la proteína de GEF-H1 a la que está unida el polipéptido inventivo. Ejemplos de cinasas activadas por p21 del grupo II son PAK4, PAK5 y PAK6.

Un sorprendente descubrimiento de la presente invención es que un polipéptido que comprende sólo los residuos 276 a 324 de PAK4 (denotados por SEC ID N°: 21) pueda unirse preferencialmente a miembros de la familia GEF-H1. Esta novedosa región de unión que abarca los aminoácidos 276 a 324 de PAK4 también comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos 298-322 (SEC ID N°: 22), es decir, altamente conservada entre las proteínas PAK del grupo II. Ese dominio conservado se denomina en el presente documento el "dominio de interacción con GEF-H1" ("GID"). Los aminoácidos 399 a 454 de PAK5, por ejemplo, tiene el 76% de identidad de secuencias con SEC ID N°: 21, pero tienen el 88% de identidad de secuencias con el dominio GID representado en SEC ID N°: 22. Por consiguiente, el alto grado de conservación entre la proteína PAK del grupo II con respecto a la región GID significa probablemente que esta región de PAK4, PAK5 y PAK6 puede unirse a diversos miembros de la familia de GEF-H1 tales como GEF-H1S (GEF-H1b), GEF-H1M (GEF-H1a) y GEF-H1U (GEF-H1c)

La presente invención engloba cualquier polipéptido de PAK4 dentro de la extensión 276-324 de aminoácidos en SEC ID N°: 21 que contiene la región GID y que todavía conserva la capacidad a unirse a una isoforma de GEF-H1. Por tanto, la presente invención engloba un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es sólo parte de la secuencia representada en SEC ID N°: 21, mientras que ese polipéptido puede unirse a isoformas de GEF-H1, y no contiene ninguna otra PAK4 u otra secuencia de proteínas PAK del grupo II. Por tanto, según la presente invención, un polipéptido tal no comprende ninguna otra secuencia de aminoácidos de PAK4, ni el polipéptido tampoco comprende ninguna otra secuencia de polipéptidos de PAK del grupo II. Por ejemplo, en el caso en el que un polipéptido comprenda los residuos 298-324 de SEC ID N°: 21, ese polipéptido no comprendería las secuencias de aminoácidos 1-297 ó 325-985 de PAK4. Sin embargo, los polipéptidos derivados de la cinasa activada por p21 de la presente invención pueden ser una parte de una proteína de fusión y asociarse con un polipéptido o proteína PAK distinto del grupo II.

La presente invención también engloba un polipéptido que comprende los residuos 280-324 de SEC ID N°: 21, los residuos 285-324 de SEC ID N°: 21, los residuos 291-324 de SEC ID N°: 21, además de otras variantes de los mismos. Por "variantes" se indica que cualquier secuencia dentro de la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 21 puede usarse como se recomienda por la presente invención, mientras que esa secuencia puede unirse a al menos una isoforma de GEF-H1.

Como se ha explicado en el presente documento, la fosforilación de PAK4 de GEF-H1 reduce o inhibe la formación de fibras de tensión y promueve lamelipodios, proliferación celular y motilidad celular. Por tanto, es probable que la administración de un inhibidor de fosforilación de PAK4 tal como un polipéptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21, o parte de la misma, aumente la formación de fibras de tensión, haciendo que las células tratadas sean menos móviles, menos invasivas y más susceptibles a los procedimientos que inducen apoptosis celular. Por ejemplo, administrar un polipéptido que comprende el dominio GID identificado en SEC ID N°: 21 y 22 podría interrumpir la motilidad celular, previniendo o reduciendo la fosforilación de GEF-H1M unido a microtúbulos. La fosforilación de GEF-H1M produce su disociación de la red de microtúbulos. Por consiguiente, el polipéptido de dominio GID podría usarse para alterar la actividad de PAK4 en GEF-H1M, interrumpiendo así la infraestructura de actina celular y la motilidad celular.

Se usó un cribado de expresión en fago para identificar dianas fisiológicas para PAK4 usando el dominio de cinasa de PAK4 (aminoácidos 291-591) fusionado a GST (glutación-S-transferasa) como 'cebo'. Los aciertos de expresión en fago aislados en el cribado se correspondieron con fusiones en marco derivadas de varios genes distintos. Un fragmento se derivó del gen similar a Maguin-2. Otros dos aciertos se derivaron de la variante de corte y empalme de GEF-H1S (GEF-H1b) de GEF-H1. A diferencia de GEF-H1M (GEF-H1a), GEF-H1 (GEF-H1b) carece de una región de dedo de cinc que se mostró que se requería para la unión a microtúbulos.

Para confirmar la interacción *in vitro* de GEF-H1S (GEF-H1b) con PAK4 se generaron proteínas de fusión de GST bacterianamente expresadas con las secuencias idénticas aisladas por expresión en fago que codifican tanto los aminoácidos 763-921 de GEF-H1S (GEF-H1b) como los aminoácidos 385-555 de la proteína similar a Maguin-2. Estas proteínas de fusión se unieron a perlas de glutatión y se utilizaron en ensayos de unión con lisados de 293T que expresan PAK4 exógena. GST-GEF-H1S (aa 763-921), pero no GST, ni el fragmento similar a Maguin-2, pudo unirse fuertemente a la proteína PAK4 marcada con myc de longitud completa ni al dominio de cinasa (aminoácidos 291-591). A diferencia, el dominio regular del extremo amino de PAK4 solo (aminoácidos 1-309) no interactuó establemente con GEF-H1S (GEF-H1b). Estos resultados sugieren que la interacción está mediada por tanto un extremo N de la región corta para el dominio de la cinasa PAK4 como por el propio dominio de cinasa.

Se usaron péptidos biotinilados derivados de la región del extremo N de la secuencia de PAK4 para mapear adicionalmente el sitio de unión a GEF-H1. Un péptido que consiste en los aminoácidos 276-324 mostró una fuerte interacción con GEF-H1S, pero no otro péptido que cubría más de la región del extremo C, los aminoácidos 291-355. Los resultados demuestran juntos que el dominio de interacción de GEF-H1 (GID) está localizado entre los aminoácidos 276 y 324 de PAK4, tal como la región que empieza en el aminoácido 291 y que termina en el aminoácido 322 de PAK4. El alineamiento de secuencias de GID de PAK4 con los dominios correspondientes de las otras PAK reveló homología significativa entre los miembros de la familia de PAK del grupo II (PAK4, PAK5 y PAK6) en esta

región. Basándose en la homología dentro del GID de PAK4 es posible que PAK5 y PAK6 también interactúen con GEF-H1 o proteínas relacionadas.

PAK4 y GEF-H1 endógenos se asocian y localizan establemente en la membrana de Golgi *in vivo*. Para confirmar que la interacción *in vitro* entre PAK4 y GEF-H1 es fisiológicamente relevante se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación con lisados de células A549, HCT116 y H1299 con anticuerpos dirigidos contra tanto PAK4, GEF-H1 como suero preinmunitario como se ha indicado. Entonces, las proteínas se analizaron por transferencia Western usando anticuerpos específicos para GEF-H1. La proteína de GEF-H1 endógena se detectó en complejos inmunoprecipitados con tanto anticuerpos para PAK4 como para GEF-H1, pero no el suero preinmunitario. Aunque las diferentes isoformas de GEF-H1 interactúan con PAK4 *in vivo*, en el caso de células H1 299 PAK4 interactúa más fuertemente con la isoforma de GEF-H1 más pequeña, mientras que en células HCT116 no se observa esta preferencia.

Estudios anteriores de PAK4 demostraron que su localización con respecto al aparato de Golgi en presencia de Cdc42 activada produjo la inducción de filopodios. Por consiguiente, en el presente documento se determinó si PAK4 y GEF-H1 endógenos se colocalizaron o no *in vivo*. Se tiñeron células H1299 con anticuerpos para PAK4 o GEF-H1 junto con anticuerpos para β -COP o el marcador de trans-Golgi, aglutinina de germen de trigo. PAK4; GEF-H1 y β -COP todos se localizan en la misma región subcelular que se visualiza por microscopía de fluorescencia. Por tanto, GEF-H1, como PAK4, están asociados a la membrana de Golgi. La tinción nuclear observada tanto con los antisueros de PAK4 como de GEF-H1 es debida a las prolongadas exposiciones requeridas para la detección de las proteínas endógenas y no es específica. Estudios de mayor resolución muestran algunas diferencias de localización dentro de la red de Golgi. Por ejemplo, PAK4 se localiza más hacia la membrana de cis-Golgi y sus MT asociados que la red de trans-Golgi.

PAK4 fosforila GEF-H1S (GEF-H1b) en serina 810 *in vitro* y *in vivo*.

Lo siguiente que se examinó fue si GEF-H1 es un sustrato de PAK4 o no. Los ensayos de cinasa *in vitro* se realizaron usando una proteína de fusión de GEF-H1 GST, una proteína de fusión de similar a Maguin-2-GST y proteína de control de GST como sustratos para la fosforilación por PAK4. En estos ensayos se encontró que el polipéptido de GEF-H1 es un sustrato de alta afinidad para PAK4 con una Km que está en el intervalo de 1 a 5 μ M. PAK4 fracasa al fosforilar el control de GST, y fosforiló débilmente la proteína de fusión GST-similar a Maguin-2.

Se encontró previamente que los péptidos derivados de la secuencia del bucle de activación de PAK4 son sustratos de alta afinidad de PAK4. Examinando la capacidad de PAK4 para fosforilar una serie de péptidos altamente relacionados con su bucle de activación fue posible deducir un consenso de sustrato aproximado para PAK4 (RRXSL(X)nG en la que n = 1 ó 2) que sugirió que tanto los residuos básicos como los residuos hidrófobos que flanquean el sitio de fosfoceptor son importantes para el reconocimiento de sustratos de alta afinidad por PAK4. Para explorar adicionalmente la selectividad del sustrato de PAK4, las secuencias de los clones de expresión en fago enriquecidas en el cribado del dominio de cinasa PAK4 se compararon con el consenso de sustrato de PAK4 putativo de los inventores. La mayoría de las secuencias, que incluyen GEF-H1S (GEF-H1b), contienen una región con alta similitud a un sustrato de PAK4 de alta afinidad. Dentro del acierto de expresión en fago de GEF-H1 que se corresponde con los aminoácidos 763-921 de GEF-H1S (GEF-H1b), un posible sitio de fosforilación de PAK4 se identificó en Ser 810 de GEF-H1S. Un péptido derivado de la secuencia que rodea este sitio (aminoácidos 807-824) también es un sustrato de alta afinidad para PAK4 con una Km similar para PAK4 a la de la proteína de fusión de GST-GEF-H1 (793-921).

Por tanto, un motivo de consenso del sustrato para la fosforilación mediada por PAK4 se identifica en el presente documento como RRXSL(X)nG en la que n es "1" o "2", X residuos y "X" es cualquier aminoácido.

Se sintetizaron diversos fosfoisómeros derivados de este péptido y se probaron para su capacidad para ser fosforilados por PAK4. Los péptidos con fosfo-serina en la posición 810 ya no fueron sustratos para PAK4. Además, se confirmó por mutagénesis que Ser 810 de GEF-H1S (GEF-H1b) es el sitio de fosforilación auténtico para PAK4 *in vitro*.

Mientras que la mutación de Ser 810 anuló la fosforilación de PAK4 de fragmentos del extremo C de GEF-H1S (GEF-H1b), un fragmento del extremo amino (aminoácidos 1-386) de GEF-H1S (GEF-H1b) contuvo sitio(s) de fosforilación de PAK4 adicional(es). La comparación de secuencias con la secuencia consenso del sustrato de PAK4 señaló a los residuos de serina 57, 66 y 67 como otros posibles sitios de fosforilación de PAK4. Sintetizando péptidos correspondientes a fosfoisómeros de los sitios de fosforilación de PAK4 putativos se determinó que Ser 67 es probablemente el sitio de fosforilación de PAK4 *in vitro* dentro del extremo amino de GEF-H1. Interesantemente, los sitios de fosforilación de PAK4 dentro de GEF-H1S (GEF-H1b) se conservan posiblemente, siendo los sitios tanto una treonina como un ácido glutámico en Cdc24, la GEF de Cdc42 de levadura que está regulada por la cinasa similar a PAK Cla4, sugiriendo la posible importancia de estos sitios. Los datos de alineamiento indican entonces que el ácido glutámico 89 del extremo N y la treonina 737 del extremo C se corresponden con Ser 67 y 810, respectivamente, en GEF-H1S (GEF-H1b) humano.

Para confirmar que la fosforilación de GEF-H1S (GEF-H1b) por PAK4 se produce en estos sitios *in vivo* se realizaron

ensayos de cotransfección y se analizó la fosforilación de GEF-H1 usando un anticuerpo fosfo-específico dirigido contra fosfo-serina 810. Este anticuerpo es específico para GEF-H1 que está fosforilado en Ser 810. Se encontró que Ser 810 está fosforilada en células de mamífero y que la fosforilación de GEF-H1S en Ser 810 está potenciada en presencia de PAK4 activada, además de PAK4 natural cuando se coexpresa con Cdc42, pero no en presencia del mutante sin actividad de cinasa y el vector. La expresión de la PAK4 sin actividad de cinasa también puede inhibir la fosforilación basal de PAK4 endógena de GEF-H1S (GEF-H1b) en Ser 810. Similarmente se desarrollaron anticuerpos fosfo-específicos contra Ser 67 en GEF-H1 (GEF-H1b) y se encontró que no sólo está la Ser 67 fosforilada en células de mamífero, sino que la cotransfección de PAK4 activada con GEF-H1S (GEF-H1b) también estimuló la fosforilación de Ser 67.

10 Cambios morfológicos mediados por alelos de GEF-H1

Los factores de intercambio de nucleótidos de la familia de Rho GTPasa participan en la regulación de estructuras citoesqueléticas y la morfología celular. Los dominios de homología conservados de Dbl (DH) y de pleckstrina (PH) son críticos para el funcionamiento de estos factores de intercambio. Se han analizado los GEF para su capacidad para estimular el intercambio sobre sustratos de Rho GTPasa *in vitro* o por su expresión en exceso *in vivo*. En el caso de GEF-H1, diversos grupos han mostrado actividad catalítica en Rac y Rho. La expresión transitoria de GEF-H1 en células Cos-7 y la expresión aislada de los dominios DH-PH de GEF-H1 muestran actividad hacia Rac *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. El análisis por ensayos *in vitro* e *in vivo* en células Cos-1 y HeLa mostró actividades medibles en Rho para GEF-H1 que estaban de acuerdo con un estudio previo.

La Tabla 1 muestra el efecto de mutantes de GEF-H1 sobre la morfología de fibroblastos; y la Tabla 2 muestra el efecto de la regulación de PAK4 de GEF-H1 en la morfología de fibroblastos.

Para analizar el efecto de GEF-H1 sobre la morfología celular en EGFP de fibroblasto (proteína verde fluorescente potenciada), las construcciones de fusión de GEF-H1S (GEF-H1b) y una serie de alelos mutantes de los sitios de fosforilación de PAK4 en GEF-H1S (GEF-H1b) se introdujeron en células NIH-3T3. También se construyó un alelo negativo dominante mutando el dominio DH de GEF-H1 produciendo GEF-H-QR312,313MG. En un ensayo del dominio de unión a p21 (PBD), este alelo negativo dominante inhibió la acumulación de Rac-GTP, pero no de Cdc42-GTP en células NIH-3T3. El citoesqueleto de actina se tiñó con cumarina-faloidina para contrastar estructuras de F-actina de células fluorescentes EGFP por microscopía.

El GEF-H1S natural (GEF-H1b) se localizó normalmente en la región perinuclear y las células aparecieron alargadas con fibras de tensión ocasionales. Por el contrario, la expresión en exceso de GEF-H1S-S810A solo conduce a una acumulación y a matriz desorganizada de fibras de tensión en comparación con células no transfectadas. La inducción de fibras de tensión es sorprendente dado los efectos relativamente modestos sobre el citoesqueleto de actina tras la expresión de cualquier alelo de GEF-H1S natural (GEF-H1b) o de PAK4 solo. La morfología de GEF-H1S-S67A que expresa el mutante DH de GEF-H1S (GEF-H1b) negativo dominante. La expresión del mutante del dominio DH GEF-H1S-QR312,313MG crea una cola de extensiones citoplásmicas naturalmente distribuidas. La inducción de fibras de tensión en el caso de GEF-H1S-S810A recuerda la activación de Rho, mientras que las extensiones citoplásmicas desorganizadas observadas con GEF-H1-Q312R,M313G y GEF-H1S-S67A podrían ser restos de colas de células no replegadas que podrían ser debidos a la inhibición de Rho. Los cambios en la localización y el citoesqueleto de actina son especialmente espectaculares en el mutante doble de GEF-H1S-(S67A-S810A). Los agregados citoplásmicos de F-actina se encontraron en EGFP-GEF-H1S (S67A-S810A) que expresa células, además de laminillas de arco ancho carentes de F-actina. La redistribución de las proteínas mutantes del sitio de fosforilación y la acumulación inapropiada de F-actina citoplásmica soporta la idea de que la localización es crítica para la capacidad de GEF-H1 para estimular fibras de tensión.

PAK4 activada y GEF-H1S (GEF-H1b) inducen la formación de lamelipodios en células NIH-3T3

La inducción de estructuras de F-actina en fibroblastos, concretamente la formación de filopodios, lamelipodios y fibras de tensión, es debida a la señalización por las formas activas de Cdc42, Rac y Rho, respectivamente. Debido a que las proteínas PAK, y específicamente PAK4, desempeñan una función en la regulación de estructuras morfológicas basadas en F-actina se crearon experimentos para determinar si los cambios inducidos por PAK4 en la morfología celular estaban mediados por la regulación de GEF-H1S (GEF-H1b). También se coexpresaron construcciones de EGFP-GEF-H1 con diversos alelos de PAK4 marcados con el epítotope HA en células NIH-3T3. Se detectó PAK4 exógena con un anticuerpo dirigido contra HA (rojo) y el citoesqueleto de actina se tiñó con cumarina-faloidina (azul). Aunque las células NIH-3T3 tienen niveles bajos, pero detectables de PAK4 y GEF-H1 endógenos, éstos no se activaron en las condiciones del experimento.

Empleando diversos alelos de PAK4 fue posible confirmar qué efectos morfológicos se accionaron mediante la fosforilación de PAK4 de GEF-H1. Coexpresando los alelos de PAK4 con el control de EGFP se produjeron efectos relativamente modestos sobre la formación de estructuras basadas en F-actina en células NIH-3T3. En células que coexpresan PAK4 natural junto con GEF-H1S natural (GEF-H1b) se observó un espectacular aumento en filopodios, a

diferencia de tanto PAK4 como GEF-H1S (GEF-H1b) expresados solos. Las estructuras de filopodios parecieron ser dependientes de la menor actividad del alelo de PAK4 natural y de la interacción con GEF-H1S (GEF-H1b) ya que no se observaron cuando se expresó tanto proteína en células solas como en controles cotransfectados con vector. En células que coexpresan PAK4 S474E activada y GEF-H1S (GEF-H1b), estas estructuras produjeron la transición de filopodios a lamelipodios en el borde de ataque. No se observaron ni filopodios ni lamelipodios cuando GEF-H1S (GEF-H1b) se transfectó junto con la cinasa inactiva PAK4 K350,351 A. Sin embargo, las fibras de tensión estaban ahora abundantemente presentes. Considerado junto con los análisis de los inventores de los mutantes de sitios de fosforilación de PAK4 en GEF-H1S (GEF-H1b), esto sugiere que la actividad de la cinasa PAK4 es responsable de la transición a la formación de lamelipodios.

Para confirmar si la formación de estas estructuras depende o no de la capacidad de PAK4 para fosforilar GEF-H1S (GEF-H1b) se usaron mutantes de sitios de fosforilación de GEF-H1S (GEF-H1b). La cotransfección de un alelo de GEF-H1S-S810A mutante junto con PAK4 S474E muestra una profusión de fibras de tensión. Esto, junto con el resultado del alelo sin actividad de cinasa, sugiere que la fosforilación de Ser 810 es responsable de tanto las señales que conducen a la formación de lamelipodios como de la inhibición de la formación de fibras de tensión en fibroblastos. Adicionalmente, PAK4 S474E y GEF-H1S-S810A se localizaron en distintos sitios periféricos que recuerdan a los sitios de unión de adhesión a células que sirven de puntos de nucleación para fibras de tensión de actina. Este tipo de localización de GEF-H1 también se ha observado en células HeLa.

A diferencia de los efectos observados por la mutación de S810, la coexpresión de GEF-H1S-S67A mutante con PAK4-S474E activada permite la formación dependiente de GEF-H1 de lamelipodios, a la vez que se evita la formación de fibras de tensión. Los experimentos de los inventores no tratan la diferencia cualitativa entre los derivados de lamelipodios de los GEF-H1S no mutantes y GEF-H1S-S67A mutante.

La actividad de intercambio de GEF-H1 se logra mediante la interacción del dominio de homología de Dbl (DH) con las Rac o Rho GTPasas en su estado inactivo. Para determinar si los efectos mediados por GEF-H1S (GEF-H1b) accionados por la fosforilación de PAK4 son dependientes o no de la actividad de intercambio de GEF-H1S (GEF-H1b) se examinaron células NIH-3T3 que coexpresan el mutante de DH negativo dominante de GEF-H1S (GEF-H1b) (Q312M,R313G) con diversos alelos de PAK4. Se observaron laminillas de arco ancho que carecían de actina, que es una diferencia de los lamelipodios ricos en actina o fibras de tensión formadas en presencia de alelos activos de GEF-H1S (GEF-H1b) y PAK4 activada. El resultado confirma que las señales de PAK4 se retransmiten directamente por las actividades de intercambio de GEF-H1. Un estudio previo de GEF-H1 mostró la inducción de lamelipodios constitutivos en células Cos-7 mediante la expresión en exceso de GEF-H1. Por tanto, se mostró que mediante la adición de un complejo de de PAK4 activada/GEF-H1S (GEF-H1b) fue posible reconstituir este efecto en células NIH-3T3.

Efectos de PAK4 mediante GEF-H1M sobre la morfología celular

Los residuos fosforilados por PAK4 en GEF-H1S (GEF-H1b) se conservan en la forma unida a MT (“microtúbulos”) de GEF-H1, “GEF-H1M”. GEF-H1M contiene un dominio de dedo de cinc en su extremo amino que permite que se una a microtúbulos. Se investigó la función de la unión a microtúbulos en la determinación de la capacidad de PAK4 para controlar la actividad de GEF-H1M. Se realizaron estudios con GEF-H1M que permitieron el examen simultáneo de tanto MT (mediante marcado de EGFP-GEF-H1M de MT *in vivo*) como del citoesqueleto de actina (mediante la tinción de F-actina con cumarina-faloidina). También se estudiaron los cambios en el citoesqueleto de MT cotiñendo con anticuerpos de β -tubulina.

En el caso de cambios morfológicos basados en F-actina, las isoformas de corte y empalme de GEF-H1 muestran algunas diferencias en sus efectos. A diferencia de GEF-H1S, que dio fibras de tensión ocasionalmente distribuidas, las células que expresan en exceso GEF-H1M mostraron frecuentemente fibras de tensión en la periferia de la célula que dieron el aspecto de un halo tejido de F-actina, sugiriendo que algo de la actividad que estimula Rho puede limitarse localmente a los extremos de MT. La ausencia de inducción de filopodios fue otra diferencia apreciable entre GEF-H1M y GEF-H1S cuando se coexpresaron GEF-H1M con PAK4 marcada con HA natural. En este caso no se observan filopodios. Sin embargo, similar a GEF-H1S, la transición a lamelipodios se observó cuando se coexpresaron con PAK4-S474E activada.

De acuerdo con los informes en la bibliografía, GEF-H1M, al igual que LFC (GEF-H1 murino), estaba establemente asociado a microtúbulos. Se sabe que la expresión en exceso de GEF-H1 estabiliza microtúbulos *in vivo*. La estabilización de MT es evidente por su alineamiento radial como se observa en células que expresan EGFP-GEF-H1M solas o cuando se coexpresan con tanto PAK4 natural como sin actividad de cinasa. Sin embargo, la coexpresión de PAK4 activada con EGFP-GEF-H1M produce la desestabilización de MT y la notable redistribución de GEF-H1M de MT al citoplasma. La polaridad de MT también se altera claramente en células que coexpresan GEF-H1M con los diferentes alelos de PAK4. Estos resultados considerados en conjunto con los hallazgos de la presente invención muestran que PAK4 puede controlar la interferencia mediada por GEF-H1 entre el citoesqueleto de actina y la red de MT.

SEC ID N°: 1

atgcctgtaacaagagcatcacagccaaggaagccctcatctgccaacaacagaaagcggccctgctg
aagaacaacaccgccttgcagtcggtttctcttcgaagtaagacaacctccgggagcggccaagctcg
gccatctacccctccgacagcttccggcagtcctcctgggctcccgcctggccgctcctccttgtct
ttagccaagagtgtttctaccaccaacattgctggacatttcaatgatgagctctcccctggggctgcgc
cggatcctctcacagtccaagactccctcaacatgcggaaccgaaccctatccgtggaatccctcatt
gacgaagcagaggtaatctacagtgagctgatgagtgactttgagatggatgagaaggactttgcagct
gactcttgagctcttgctgtggacagcagcttctgcagcagcataaaaaggaggtgatgaagcagcaa
gatgtcatctatgagctaataccagacagagctgcacatgtgaggacactgaagatcatgacccgcctc
ttccgcacggggatgctggaagagctacacttgagccaggagtggtccagggcctgttcccctgcgtg
gacgagctcagtgacatccatacacgcttccctcagccagctattagaacgcccagcggccagccctgtgc
cctggcagcaccggaaactttgtcatccatcgcttgggtgatctgctcatcagccagttctcaggtcct
agtgcggagcagatgtgtaagacctactcggagttctgcagccgccacagcaaggccttaagctctat
aaggagctgtacgcccagagacaaacgcttccagcaattcatccggaaagtgacccgccccgcctgctc
aagcggcacggggtacaggagtgcatcctgctggtgactcagcgcataccaagtaccggttactcatc
agccgcatcctgcagcattcccacgggatcgaggaggagcggcaggacctgaccacagcactggggcta
gtgaaggagctgctgtccaatgtggacgagggatattatcagctggagaaagggcccgctctgcaggag
atctacaaccgcatggaccctcgggcccacccagtgctggcaagggcccctttggccgagaggaa
cttctgagggcgaactcatccacgatggctgctgctggaagacagcgcaggggcttcaaagat
gtgttagtgctgctgatgacagatgtactgggtgttctccaggaaaaggaccagaagtacatcttccct
accctggacaagccttcagtggtatcgctgcagaatctaatacgtacgagacattgccaaaccaggagaaa
gggatgtttctgatcagcgcagccccacctgagatgtacgaggtgcacacagcatcccgggatgaccgg
agcacctggatccgggtcattcagcagagcgtgcccacatgccatccaggaggacttcccctgatt
gagacagaggatgaggcttacctgcggcgaattaagatggagttgcagcagaaggaccgggactgggtg
gagctgctgcgagagaaggtcgggctgtttgctgagatgaccatttccaggccgaagaggatgggtggc
agtgggatggccctgccaccctgccaggggctttccgctctgagctccttgagctcccctcgtggc
gagcggctgctgcaggatgccatccgtgaggtggagggctgaaagacctgctgggtggggccaggagtg
gaactgctcttgacaccccagagaccagccctgcccttgaaccagacagcgggtggaacacagagtcct
ggggtcactgccaatggtgaggccagaacctcaatggctccattgaactctgcagagctgactcagac
tctagccagagggatcgaaatggaaatcagctgagatcaccgcaagaggaggcgttacagcगतtggtc
aatctctatggacttctacatggcctacaggcagctgtggcccagcaggacactctgatggaagcccgg
ttccctgagggcctgagcggcgggagaagctgtgccgagccaactctcgggatggggaggctggcagg
gctggggctgccctgtggcccctgaaaagcaggccacggaactggcattactgcagcggcaacatgcg
ctgctgcaggaggagctacggcgtgccggcggctaggtgaagaacgggcaaccgaagctggcagcctg
gaggcccggctccgggagagtgagcaggcccgggactgctggagcgtgaggccgaagaggctcgaagg
cagctggccgcctggggccagaccgagccaactcccagctgaggccccctgggcccagacactgtggat
cctcggcggcgcagcctccccgaggcgatgcctgtacttgagtttcaacccccacagcccagccga

ggcaetgaccgctggatctacctgtcactactcgctctgtccatcgaaactttgaggaccgagagagg
caggaactggggagccccgaagagcggtgcaagacagcagtgaccctgacactggcagcgaggaggaa
ggtagcagccgtctgtctccgccccacagtcacagaggtgagaccctggcggagacatggaccagagac
tttaccagaatgcaggacatcccggaggagacggagagccgacggggaggctgtagcctccgagagc
taa

SEC ID N°: 2

MPVTRASQPRKPSAQQQKAALLKNNTALQSVSLRSKTTIRERPSSAIYPSDSFRQSLGSRGRSSLS
LAKSVSTTNIAGHFNDESPLGLRRILSQSTDSLNMNRNRLSVESLIDEAEVIYSELMSDFEMDEKDFAA
DSWSLAVDSSFLQOHKKEVMKQQDVIYELIQTELHHVRTLKIMTRLFRTGMLEELHLEPGVVQGLFPCV
DELSDIHTRFLSOLLERRRQALCPGSTRNFVIHRLGDLLISQFSGPSAEQMCKTYSEFCSRHSKALKLY
KELYARDKRFQQFIRKVTRPAVLKRHGVEQECILLVTRITKYPLLSRILQSHSGIEEERQDLTTALGL
VKELLSNVDEGIYQLEKGARLQEIYNRMDPRAQTPVPGKPGFGREELLRRKLIHDGCLLWKTATGRFKD
VLVLLMTDVLVFLQEKDQKYIFPTLDKPSVVSLQNLIVROIANQEKMFLLISAAPPEMYEVHTASRDDR
STWIRVIQOSVRTCPSREDFPLIETEDEAYLRRIKMELOQKDRALVELLREKVGLFAEMTHFQAEEDGG
SGMALPTLPRGLFRSESLES PRGERLLQDAIREVEGLKDLLVGPVVELLLTPREPALPLEPDSGGNTSP
GVTANGEARTFNQSIELCRADSDSSQRDRNGNQLRSPQEEALQRLVNLVYGLLHGLQAAVAQQDTLMEAR
FPEGPERREKLCRANSRDGEAGRAGAAPVAPEKQATELALLQRQHALLQEELRRCRRLGEERATEAGSL
EARLRESEQARALLEREAEEARRQLAALGQTEPLPAEAPWARRPVDPRRSLPAGDALYLSFNPPQPSR
GTDRLDLPVTTTRSVHRNFEDRERQELGSPPEERLQDSSDPDTGSEEEGSSRLSPPHSPRGETLAETWTRD
FTRMQDIPEETESRDGEAVASES

SEC ID N°: 3

5 RRRSLPAGDALYLSFNPP

SEC ID N°: 4

RQSLGSRGRSSLSLAK

SEC ID N°: 5

RGETLAETWT

10 **SEC ID N°: 6**

RBSZXG

SEC ID N°: 7

CPRRRSLPAGDALYLSFNPP

SEC ID N°: 8

15 CRQSLGSRGRSSLSLAK

SEC ID N°: 9

CRQSLGSRGRSSLSLAK

SEC ID N°: 10

TGTAGATCCTCGGCGGCGCTCTCCCCGCA

SEC ID Nº: 11

GGTGATGCCCATGGTCTCCAGCAGGAT

SEC ID Nº: 12

ATCCTGCTGGTGACCATGGGCATCACCA

SEC ID Nº: 13

5 GCCGTGGCCGCTCCGCCTTGTCTTTA

SEC ID Nº: 14

TAAAGACAAGGCGGAGCGGCCACGGC

SEC ID Nº: 15

QRITKY

10 **SEC ID Nº: 16**

GCAGAATTCTGTAACAAGAGCATCACA

SEC ID Nº: 17

GCGCTCGAGTTAGCTCTCGGAGGCTACAGCCT

SEC ID Nº: 18

15 RRKSLVGTPYWMAPE

SEC ID Nº: 19

biotina-LC-LC-RRKELVG(pT) PYWMAPE

SEC ID Nº: 20

RBSZXL

20 **SEC ID Nº: 21**

CTPAAPAVPGPPGPRSPQREFQRVSHQFRAALQLVVDPGDPRS YLDF

SEC ID Nº: 22

RVSHEQFRAALQLVVDPGDPRS YLD

EJEMPLOS25 **Ejemplo 1****Clonación de GEF-H1S** (GEF-H1b)

30 Se usaron los cebadores MC1 GCAGAATTCTGTAACAAGAGCATCACA (SEC ID Nº: 16) y MC3b GCGCTCGAGTTAGCTCTCGGAGGCTACAGCCT (SEC ID Nº: 17) diseñados a partir del nº de registro KIAA0651 depositado en el NCBI (Centro nacional de información biotecnológica, EE.UU.) en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen GEF-H1S de un ADNc de plásmido de cerebro completo humano (nº de cat. de Clontech Laboratories HL9002CC). Se realizaron veinte rondas de PCR usando la polimerasa EXPAND (Roche Molecular, EE.UU. nº de cat. 1681834). El cebador MC1 se introdujo en un sitio de la enzima de restricción EcoRI en la posición 5' y MC3b contiene un sitio de enzima de restricción XhoI en la posición 3'. Las secuencias de los sitios de enzimas de restricción no son parte de la secuencia de GEF-H1b nativa. El producto de PCR resultante se insertó en un vector de plásmido digerido con restricción de EcoRI y XhoI, el esqueleto de pcDNA (nº de cat. de Invitrogen V790-20) con un sitio de clonación múltiple modificado. Entonces, el gen GEF-H1S se escindió usando las enzimas de restricción HindIII y XbaI y se insertó en un vector de expresión similarmente restringido, pRSV/Rc (Promega, EE.UU.).

Ejemplo 2**Expresión y proliferación independiente del anclaje**

Un clon que se expresa establemente designado 192.58 que contiene GEF-H1S se estableció en la línea celular de fibroblasto de ratón, NIH-3T3. El vector subclonado pRSV/Rc expresa la proteína de GEF-H1S en células de cultivo de

Los clones de GEF-H1S se sembraron en recipientes de cultivo de tejido que evitan la adherencia. Las células que expresan en exceso GEF-H1S son independientes del anclaje. Las células NIH-3T3 que sólo albergan el vector vector de expresión pcDNA no se transformaron espontáneamente cuando se previno el anclaje. Sólo se mostró que los clones que albergan el gen GEF-H1S sobrevivían y proliferaban. Por tanto, la expresión de GEF-H1S permite la supervivencia independiente del anclaje y la proliferación de células NIH-3T3. La capacidad de las células para proliferar se midió usando el ensayo basado en la sal de tetrazolio XTT (nº de cat. de Roche Molecular Biochemicals 1465015) que sólo midió células metabólicamente activas en cultivo. Las mediciones se hicieron durante un periodo de tiempo.

Ejemplo 3**Efecto de GEF-H1S (GEF-H1b) en un modelo de tumor de ratón**

Las células 192.58 formaron tumores cuando se transfirieron a ratones sin pelo atímicos. Ocho ratones por grupo se inyectaron subcutáneamente con células NIH-3T3 que albergaban tanto un vector de expresión pcDNA de control como el vector de expresión pcDNA que expresaba el gen GEF-H1S. Se midieron tumores palpables en ratones tratados con las células 192.58 durante un periodo de tiempo. Se detectaron tumores no palpables en ratones implantados con células que albergaban el vector de expresión pcDNA.

Ejemplo 4**GEF-H1S (GEF-H1b) es un sustrato para PAK4**

Los reactivos usados específicamente para la recuperación del primer polipéptido de GEF-H1S fue un plásmido de expresión pGEX-4T (nº de cat. de Amersham Biosciences 27-4581-01) que albergaba un polipéptido del dominio catalítico de PAK4 que representa los aminoácidos 291 a 591. Este vector de expresión permitió la producción y la expresión de un gen apropiadamente insertado como una proteína de fusión en la que el componente de fusión es el producto de proteínas del gen SJ26 glutatión-S-transferasa (GST). El componente de fusión de GST permite la inmovilización de la afinidad en la matriz de glutatión-Sepharose 4B (nº de cat. de Amersham Biosciences 17-0756-01) también conocida como perlas de glutatión. El polipéptido de PAK4 inmovilizado a estas perlas se incubó con un lisado que contenía partículas de fago que expresaban una biblioteca de péptidos derivados de ADNc de MCF7 (células de cultivo de tejido de carcinoma de mama disponibles de ATCC, EE.UU.). Véase Zozulya y col., Nat. Biotechnol., 17(12): pág. 1193-8, 1999. Tras la secuenciación de muchos de los candidatos obtenidos en esta criba se descubrió el polipéptido de GEF-H1S en el clon designado 13-8. La secuenciación se realizó en una máquina ABI prism usando procedimientos convencionales proporcionados por el fabricante (Applied Biosystems, EE.UU.).

Ejemplo 5**PAK4 puede fosforilar GEF-H1S (GEF-H1b) *in vitro***

El ADNc que codifica GEF-H1S obtenido en el cribado de expresión en fago se escindió y se subclonó en el vector de expresión pGEX-4T para permitir la producción de proteína recombinante para experimentos *in vitro*. Entonces, la proteína de GEF-H1S se mezcló con la cinasa PAK4 y se incubó de forma que PAK4 fosforiló el GEF-H1S. Una parte de esta reacción de cinasa se separó por SDS-PAGE y se autorradiografió para visualizar el grado de fosforilación. La autorradiografía mostró la fosforilación del polipéptido de GEF-H1S y la no fosforilación del componente de fusión de GST. La SDS-PAGE es una separación universal de proteínas y la técnica de visualización que se describe en Laemmli, Nature, 227(259):680-5, 1970.

Ejemplo 6**La serina 810 y la serina 67 de GEF-H1S (GEF-H1b) se fosforilan por PAK4 *in vitro***

De los experimentos de fosforilación descritos anteriormente, dos péptidos de GEF-H1S se identificaron como diana para la fosforilación inducida por PAK4. Los residuos diana de GEF-H1S se identificaron alineando el péptido del bucle de activación de PAK4 con los aminoácidos 762 a 921 de la secuencia de polipéptidos de GEF-H1S. Los ensayos de cinasa *in vitro* mostraron posteriormente que los péptidos de GEF-H1S PRRRSLPAGDALYLSFNPP (SEC ID Nº: 3) y RQSLGSRGRSSLSLAK (SEC ID Nº: 4) están fosforilados por PAK4.

El grado de fosforilación de estos sustratos de péptidos se comparó visualmente por autorradiografía y empíricamente se determinó un consenso de fosforilación del sustrato. Pudo predecirse una secuencia consenso que era, por ejemplo, RBS2X[G/L] en la que R es el aminoácido arginina; B es cualquier aminoácido básico; S es el aminoácido serina; Z es cualquier aminoácido hidrófobo; X es cualquier aminoácido, G es glicina y L es leucina. La identificación del residuo de aminoácidos se realizó por el ensayo de cinasa usando PAK4 como enzima e isómeros de regiones de sustrato predichas de GEF-H1S.

Los siguientes fosfoisómeros (péptidos de GEF-H1S modificados con fosfato) se usaron en el ensayo de la cinasa PAK4 para determinar qué residuos estaban específicamente fosforilados. Debido a que se modificaron ciertos residuos para que comprendieran un resto fosfato (los siguientes residuos subrayados), no pudieron fosforilarse por PAK4. Estos resultados revelaron que las serinas 810 y 67 de GEF-H1S son sitios de fosforilación para PAK4.

Identificador	Secuencia de péptidos	Región de proteína
681 (SEC ID Nº: 18)	RRKSLVGT <u>P</u> YWM <u>A</u> PE	Bucle de actividad de PAK4
1008 (SEC ID Nº: 3)	RRRSLPAGDAL <u>Y</u> LS <u>E</u> NPP	GEF-H1 (807-824)
1009 (SEC ID Nº: 3)	RRR <u>S</u> LPAGDAL <u>Y</u> LSFNPP	GEF-H1 (807-824)
1010 (SEC ID Nº: 3)	RRRSLPAGDAL <u>Y</u> SE <u>N</u> PP	GEF-H1 (807-824)
1412 (SEC ID Nº: 4)	RQ <u>S</u> LLG <u>S</u> RRGR <u>S</u> SLSLAK	GEF-H1 (55-72)
1413 (SEC ID Nº: 4)	RQ <u>S</u> LLG <u>S</u> RRGR <u>S</u> SLSLAK	GEF-H1 (55-72)
1414 (SEC ID Nº: 4)	RQ <u>S</u> LIG <u>S</u> RRGR <u>S</u> SLSLAK	GEF-H1 (55-72)

Ejemplo 7

GEF-H1S (GEF-H1b) interactúa con PAK4

La prueba adicional de que GEF-H1S es un sustrato para PAK4 se obtuvo usando la técnica de inmovilización sobre GST descrita anteriormente para mostrar la interacción de GEF-H1S inmovilizada sobre GST con diferentes alelos de PAK4 expresados en células 293T. Las técnicas de inmunoprecipitación tanto para la afinidad de proteínas como la inmunoprecipitación mediada por antígeno-anticuerpo se describen en Lew y col., J. Immunol. Methods, 136(2):211-9, 1991; y Anderson y col., Methods Enzymol., 96:111-20, 1983.

El polipéptido de GEF-H1S inmovilizado sobre GST se usó para realizar la inmunoprecipitación de los extractos de células 293T. Los complejos de proteínas resultantes sobre las perlas se identificaron mediante la separación en SDS-PAGE seguido de transferencia Western para identificar proteínas que están presentes. La técnica de transferencia Western (Renart y col., Methods Enzymol., 104:455-60, 1984) se usa universalmente para identificar proteínas usando inmunoreactivos específicos como anticuerpos. La proteína PAK4 se fusionó con esta marca de afinidad myc, Cravchik y col., Gene, 137(1):139-43, 1993, y se mostró que los alelos de PAK4 estaban presentes usando el anticuerpo monoclonal específico para la marca de afinidad myc. La detección de PAK4 después de la inmunoprecipitación con GEF-H1S inmovilizado sobre las perlas GST mostró una interacción física entre estas dos proteínas en una disolución de proteínas celulares. PAK4 no estuvo presente después de la inmunoprecipitación con el componente de fusión inmovilizado GST. Esta interacción se limitó por la presencia o ausencia de GEF-H1S.

Ejemplo 8

GEF-H1S (GEF-H1b) como biomarcador basado en mecanismo para la actividad de la cinasa PAK4 en tumores

Los anticuerpos específicos para PAK4 se generaron en conejos inmunizando conejos con el péptido conjugado a KLH CSGDRRRAGPEKRPKSS, que es parte de la proteína PAK4, conjugado con KLH. Véase, Nims y col., 1973. 23(3):391-6; y Hashimura y col., 1982. Los anticuerpos específicos para GEF-H1 también se generaron en conejos inmunizando con el polipéptido de GST-GEF-H1S que comprende los aminoácidos 762 a 921.

El suero del anticuerpo para PAK4 estaba ligado (por interacción de la porción Fc de la inmunoglobulina del isotipo IgG a la proteína G de *S. Aureus*) a perlas de proteína G (Roche molecular, EE.UU., nº de cat. 124 3233). Las perlas cargadas con anticuerpo para PAK4 se mezclaron con lisados celulares de tres líneas de células tumorales humanas A549, HCT116 y H1299 (ATCC, EE.UU.). El inmunoprecipitado resultante se separó en SDS-PAGE y se sometió a transferencia Western. Se mostró que el anticuerpo específico para GEF-H1 inmunoprecipitó el GEF-H1 endógeno. Este resultado confirma la presencia de GEF-H1S en los tres lisados de células tumorales. La interacción de PAK4 endógena se demostró por la detección de GEF-H1 endógeno en la transferencia Western cuando se sondó con el anticuerpo específico para GEF-H1. La interacción está limitada por la presencia y la ausencia de PAK4.

Ejemplo 9**Los anticuerpos fosfoespecíficos para GEF-H1S (GEF-H1b) son una herramienta para monitorizar la actividad de la cinasa PAK4 en tumores**

- 5 Se usaron los péptidos conjugados con KLH CPRRRSLPAGDALYLSFNPP (SEC ID N°: 7), CRQSLLGSRRGRSSLAK (SEC ID N°: 8) y CRQSLLGSRRGRSSLAK (SEC ID N°: 9) para generar anticuerpos en conejos. Los residuos de serina subrayados en negrita, "S", denotan residuos modificados por fosfato. "Dirigido contra 1009" es un anticuerpo que detecta proteína de GEF-H1 fosforilada en la serina-810 de SEC ID N°: 7. Los anticuerpos que se producen contra péptidos que comprenden las secuencias descritas en SEC ID N°: 8 y 9 reconocen las formas fosforiladas de serina-67 de los péptidos de GEF-H1.
- 10 La capacidad de los antisueros para reconocer proteína de GEF-H1S fosforilada en serina-810 se demostró en un experimento en el que las células 293T (ATCC, EE.UU.) se transfectaron transitoriamente para expresar simultáneamente GEF-H1S y diferentes alelos de PAK4.
- 15 En este experimento, el vector de expresión GEF-H1S fue pRSV/Rc y el vector de expresión de PAK4 fue pcDNA. Los lisados se prepararon a partir de las células 293T transfectadas y se analizaron por transferencia Western usando el reactivo dirigido contra 1009. Los resultados demuestran un marcado aumento en GEF-H1S fosforilado por encima de la fosforilación basal (significa que una parte de GEF-H1S ya está fosforilado por la cinasa endógena) en presencia de PAK4 natural (1-591) y mutante de PAK4, S474E, y una marcada disminución en el nivel de fosforilación en presencia de K350,351 A sin actividad de la cinasa PAK4. Estos anticuerpos fosfoespecíficos pueden usarse para detectar la actividad de PAK4 en tumores en virtud de su fosforilación específica de GEF-H1.

Ejemplo 10**Construcción de alelos de GEF-H1S (GEF-H1b)**

- 25 La siguiente lista se refiere a alelos que representan alelos de GEF-H1S naturales, de mutantes de S810A y de QR312,313MG construidos en la presente invención. Con respecto al último alelo, la glutamina 312 y la arginina a 313 de la proteína de GEF-H1S se mutaron por metionina y glicina, respectivamente, de ahí la designación, "QR312,313MG". Similarmente, "S810A" indica que el residuo de serina en la posición de aminoácido 810 de la proteína de GEF-H1S se mutó por una alanina. La mutagénesis se realizó por tanto la reacción de PCR como la mutagénesis dirigida a sitio.

Aminoácidos	Alelos
1-921	natural, S810A, QR312,313MG, S67A
1-386	natural
386-921	natural
123-921	natural, S810A
51-921	natural, S810A
94-486	natural

Oligonucleótidos usados en mutagénesis:

- 30 **MC27** TGTAGATCCTCGGCGGCGCTCTCCCGCA (SEC ID N°: 10). Los residuos en negrita "GCT" denotan un sitio XhoII que cambia el codón Ser810 por alanina. Éste estaba apareado con MC3b y se usó en una reacción de PCR creando un fragmento que cuando se restringió con XhoII y XhoI pudo sustituirse con fragmento de ADNc natural en el plásmido que contenía la secuencia de ADNc que codifica los aminoácidos 386-921 (restringida con BamHI y XhoI). El plásmido resultante recientemente construido contuvo una alanina en la posición 810 de GEF-H1S. Este polipéptido mutante se escindió con BclI y XhoI y se unió a un fragmento BclI de EcoRI que constituye el resto del gen que lo hace de longitud completa.
- 35 Se usaron **MC40** GGTGATGCCCATGGTCTCCAGGAGGAT (SEC ID N°: 11) apareado con MC1 y **MC41** ATCCTGCTGGTGACCATGGGCATCACCA (SEC ID N°: 12) apareado con MC3b en reacciones separadas para crear fragmentos de solapamiento que podrían unirse restringiendo con EcoRI, NcoI y XhoI. MC40 y MC41 contienen codones que producen el alelo mutante de QR312,313MG.
- 40 Se usaron **MC57** GCCGTGGCCGCTCCGCTTGCTTTA (SEC ID N°: 13) y **MC58** TAAAGACAAGGCGGAGCGGCCACGGC (SEC ID N°: 14) en una reacción de mutagénesis dirigida a sitio (n° de cat. de Stratagene 200519, EE.UU.) que produjo plásmido en el que una alanina se colocó en la posición 67. Esta reacción se realizó en el vector pBLUESCRIPT que contiene el fragmento que codifica el polipéptido 1-386. Este trozo se unió al resto de los alelos de GEF-H1 (natural, S810A, QR312,313MG) por restricción con EcoRI, SacI y XhoI.

Ejemplo 11**Análisis de alelos de GEF-H1S (GEF-H1b)**

La transducción de señales que implica la familia Rho de GTPasas participa en un amplio intervalo de respuestas celulares tales como reorganización del citoesqueleto de actina, expresión génica, apoptosis, acontecimientos de tráfico en la membrana, señalización mitogénica y transformación maligna. Normalmente, las mutaciones dentro del motivo "QRITKY" (SEC ID N°: 15) altamente conservado del dominio DH hacen que la proteína sea incapaz de unirse a la proteína Rho GTPasa y, por tanto, enzimáticamente inactiva.

Los ensayos de transformación *in vitro* según el procedimiento de Clark y col., Methods Enzymol., 225:395-412, 1995, mostraron que GEF-H1S natural puede inducir focos en células NIH-3T3. Los ensayos de cotransformación entre Ras activada con valoraciones de GEF-H1S natural y GEF-H1S QR312, MG313 mostraron que GEF-H1S sinergiza con Ras activada, sin embargo GEF-H1S QR312, MG313 inhibe focos formados por Ras activada.

Ejemplo 12**Localización y cambios morfológicos**

Los alelos de GEF-H1S se expresaron transitoriamente en células NIH-3T3 o se expresaron simultáneamente con alelos de PAK4. Los alelos de GEF-H1S se recuperaron del vector pcDNA por restricción con EcoRI y XhoI y se insertaron en pEGFP-C1 (Clontech, EE.UU., n° de cat. 6082-1) restringido con EcoRI y Sall. La proteína resultante fue un híbrido de la proteína brillantemente fluorescente proteína verde fluorescente (GFP). Los efectos sobre la morfología celular se siguieron tiñendo F-actina con cumarina-faloïdina (Molecular Probes, EE.UU., n° de cat. C-606). Para los experimentos que demuestran la colocalización con PAK4, PAK4 estuvo en el vector de expresión pcDNA con tanto un marca de afinidad myc como HA y se detecta por el anticuerpo monoclonal, "9E10" o "HA7", emparejado con antiratón de cabra ligado a rodamina (Santa Cruz, EE.UU.) que fluoresce rojo. GEF-H1S natural se localiza en la región perinuclear del aparato de Golgi. Véase Callow y col., 2002. Este hallazgo estuvo de acuerdo con que GEF-H1S es un sustrato para PAK4 porque PAK4 activada también está localizada en el aparato de Golgi.

Sin embargo, el mutante de fosforilación S810A se localizó en el citoplasma, que indica que la fosforilación de S810 es importante para la localización de GEF-H1S. También se encontró que el mutante de DH QR312, MG313 estaba localizado en el citoplasma y mostró un patrón de tinción de agregados citoplásmicos. Estas observaciones fueron específicas para alelos de GEF-H1S ya que la propia GFP no se localizó en ningún compartimento celular similar.

La expresión del alelo natural de PAK4 simultáneamente con el alelo natural de GEF-H1S en células NIH-3T3 indujo la formación de microespículas de actina periféricas similares a aquellas atribuidas a la expresión en exceso de la Rho GTPasa Cdc42. Esto sugiere una función importante para tanto PAK4 como GEF-H1S en la formación de estas estructuras. La expresión simultánea de PAK4 S474E activada y GEF-H1S produjo la formación de lamelipodios que implican adicionalmente PAK4 y GEF-H1S como complejo de proteínas que participan en la señalización de Rho GTPasa. Véase Nobes y col., Biochem Soc Trans., 23(3):456-9, 1995. Estas morfologías basadas en actina fueron específicas para la cinasa PAK4 combinada y la actividad de intercambio de GEF-H1 debido a que no hubo estructuras basadas en actina cuando la cinasa inactiva se expresó con GEF-H1 natural. Similarmente, la combinación de PAK4 y el factor de intercambio del mutante inactivo evitaron la formación de estructuras basadas en actina.

Ejemplo 13

Este ejemplo contiene información adicional sobre ciertos procedimientos descritos en el presente documento.

Clonación de GEF-H1

El plásmido pGEX-4T (n° de cat. de Amersham Biosciences 27-4581-01) que expresa un polipéptido del dominio catalítico de PAK4 (aminoácidos 291-591) se usó como cebo en un cribado de expresión en fago para interactores de proteína. La biblioteca de expresión en fago se derivó de la línea de tumor de mama MCF-7. Las secuencias de los plásmidos de fago se usaron para buscar en la base de datos en el Centro nacional de información biotecnológica (NCBI) usando la herramienta de búsqueda Basic Local Alignment (BLAST). Dos de los ADNc se correspondieron con > 99% de identidad con el ADNc denotado KIAA0651 (número de registro de Genbank: AB014551) y varios solapamientos expresaron marcas de secuencias (EST). Durante la clonación de GEF-H1 se encontró que el gen tenía tres isoformas de corte y empalme principales, GEF-H1M, GEF-H1S y GEF-H1U. La isoforma GEF-H1S (aminoácidos 1-921) se diferencia de las formas de corte y empalme GEF-H1M debido a un mini-exón de 7 aminoácidos, además de la falta del exón que codifica el dominio de dedo de cinc del extremo N. La forma de corte y empalme denominada en lo sucesivo GEF-H1M contiene la región de dedo de cinc que participa en la unión a microtúbulos y es idéntica a la versión de longitud completa (aa 1-985) denominada en lo sucesivo GEF-H1. Las secuencias en marco se subclonaron en pGEX-4T para el análisis del sustrato.

Plásmidos y construcciones de ADN

Para obtener GEF-H1S, los oligonucleótidos MC1 GCAGAATTCTGTAACAAGAGCATCACA y MC3b GCGCTCGAGTTAGCTCTCGGAGGCTACAGCCT derivados de la secuencia KIAA0651 se usaron en 20 rondas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen de una biblioteca de ADNc de plásmido de cerebro completo humano (nº de cat. de CLONTECH Laboratories HL9002CC). Se obtuvo un fragmento de "3000 pb", se subclonó y se secuenciaron tres clones dando resultados idénticos. Se usó una EcoRI- XhoI para subclonar en marco en un vector pcDNA que alojaba el epítipo 5' de HA para MCS. El fragmento de EcoRI - XhoI de clones de pcDNA se usó para el lanzamiento de todos los alelos de GEF-H1 para la pEGFPC digerida por EcoRI-Sall en marco (Clontech), respectivamente.

La S810A mutante se introdujo por reacción de PCR con los oligonucleótidos MC27 TG TAGATCCTCGGCGGCGCTCTCCCGCA y MC3b. El inserto mutante se introdujo en un mutante de delección de GEF-H1S que abarcaba los nucleótidos 1100 - 2761 y el fragmento BamHI -XhoI natural se sustituyó con el fragmento de XhoI y XhoI mutante. Los oligonucleótidos MC40 GGTGATGCCCATGGTCTCCAGCAGGAT, MC1, MC41 ATCCTGCTGGTGACCATGGGCATCACCA y MC3b se usaron para crear el solapamiento de fragmentos de EcoRI-NcoI y NcoI-XhoI para convertir residuos de QR en MG en el motivo QRITY altamente conservado del dominio DH. S67A se creó usando los oligonucleótidos MC57 GCCGTGGCCGCTCCGCCTTGCTTTA y MC58 TAAAGACAAGGCGGAGCGGCCACGGC y GEF-H1S con pBluescript que abarcaba 1-626 como esqueleto en una reacción de mutagénesis dirigida a sitio (Stratagene). Este fragmento mutante se digirió con EcoRI - SacI y se unió al resto del gen con un fragmento Sac-XhoI generado a partir de alelos mutantes y naturales. Como las proteínas de GEF-H1M y S sólo se diferencian en sus extremos amino se generaron como un híbrido uniendo secuencias mutantes y naturales derivadas de GEF-H1S. La única secuencia en 5' se generó con los oligonucleótidos MC61 GCGGAATTCATGTCTCGGATCGAATCCCTCA y MC62 GTC ACTGAGCTCGTCCACGCAGGGGA en una reacción de PCR usando el clon 4157775 IMAGE (Research genetics) como molde.

Preparación de proteínas recombinantes, secuencia de péptidos y ensayos de cinasa

PAK4 (residuos 291-591) fusionada con glutatión-S-transferasa (GST), los aminoácidos 763-921 de GEF-H1 (del clon de fago 13.8, apareamientos de secuencia KIAA0651) y similar a Maguin 2 (del clon de fago 13.32, nº de registro de apareamientos de secuencia XP-087831) se purificaron por procedimientos convencionales y como se ha descrito previamente 31. Se usó la secuencia de aminoácidos de péptidos que abarca 807-824 de GEF-H1b nº 1008 (RRRSLPAGDALYLpSFNPP), nº 1009 (RRRpSLPAGDALYLSFNPP), nº 1010 (RRRSLPAGDALpYLSFNPP) y nº 934 (RRRSLPAGDALYLSFNPP) para los ensayos de cinasa *in vitro*. Las reacciones de cinasa *in vitro* se ejecutaron como se ha descrito previamente 31.

Anticuerpos e inmunoreactivos

El péptido ligado a KLH (nº 1009) CRRRSLPAGDALYLSFNPP (residuos 807-824) con una serina fosforilada en la posición 810 y GST-GEF-H1 (nº 104) (residuos 762-921) se usaron como antígenos para producir antisuero en conejos. Los anticuerpos para PAK4 se derivaron de los antígenos (nº 933) CATTARGGPGKAGSRGRFAGHSEA (residuos 122 - 144) y (nº 80) CSGDRRRAGPEKRPKSS (residuos 148 - 163). La especificidad se analizó como se ha descrito previamente. Los conjugados de peroxidasa de rábano picante de cabra dirigidos contra IgG de ratón y de conejo fueron de Roche molecular. La IgG de cabra dirigida contra ratón y conejo ligada a fluoróforos FITC o rodamina fueron de Santa Cruz Biotechnology y la IgG de ratón dirigida contra α -tubulina fue de Zymed. La cumarina-faloidina y la faloidina-FITC fueron de Molecular Probes. Anti-cascade Blue de ratón y los colorantes fluorescentes; Texas red, FITC o azul marino se obtuvieron y se conjugaron con anticuerpos según el fabricante. Las disoluciones de reactivo de reticulación se inactivaron desalando mediante G25-Sephadex y mezclando con cloruro de amonio a una concentración final de 50 mM.

Transfecciones de células e inmunofluorescencia

Se mantuvieron células NIH-3T3, 293T, A549, HCT116 y H1299 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal al 10% (SBF), penicilina y estreptomocina de Invitrogen (Carlsbad, CA). Para la transfección, las células se sembraron a 10^5 células ml^{-1} para células NIH-3T3 y 10^4 ml^{-1} para tanto 293T como H1299, a menos que se estableciera de otro modo. Los reactivos de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen) o Fugene (Roche Molecular) se usaron a $3 \mu g \mu g^{-1}$ de ADN de plásmido. Los extractos celulares para la inmunotransferencia se prepararon en tampón de lisis. Para los experimentos de inmunoprecipitación, los lisados se incubaron con perlas de proteína G (Pharmacia) ligadas a anticuerpo apropiado, perlas de glutatión-Sepharose (Pharmacia) con proteína de fusión de GST apropiada y perlas de estreptavidina (Pierce) ligadas a péptidos biotinilados apropiados. Para la inmunofluorescencia se colocaron cubreobjetos en recipientes de cultivo celular de 24 pocillos y se sembraron a las densidades anteriores. Las transfecciones tuvieron lugar después de 16 h y, a menos que se estableciera de otro modo, se mantuvieron en Optimem o DMEM con SBF al 0,2% durante 24 h hasta la fijación. La microscopía se realizó en un microscopio Nikon E800 con 60X objetivo (1,5 NA). Las imágenes se capturaron con una cámara CCD SPOT y se pseudocolorearon con el

software de imágenes SPOT (Diagnostic instruments).

Ejemplo 14

Medición de la actividad de la cinasa PAK4 en células completas usando ELISA

- 5 El nivel de fosforilación de GEF-H1S dependiente de PAK4 puede determinarse monitorizando la unión de un anticuerpo fosfoespecífico para GEF-H1S según el siguiente protocolo. Se recubrieron previamente placas de ELISA (Corning, placas de 96 pocillos, nº de cat. 25805-96) con anticuerpo monoclonal dirigido contra HA a 5 µg/ml en PBS usando 100 µl de volumen final por pocillo y se guardaron durante la noche a 4°C. Entonces, el tampón de recubrimiento se eliminó y se sustituyó por tampón de bloqueo (BSA al 2% en TBST) y entonces la placa entera se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- 10 Entonces, las placas de cultivo de tejido se recubrieron con poli-L-lisina usando 50 µl por pocillo y luego se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Entonces, las placas se aclararon con PBS, el líquido adicional se eliminó por aspiración y se dejó que se secaran completamente antes de uso. Cuando se secaron se sembraron células TR-293-KDG en cada pocillo a 2×10^4 células por pocillo en un volumen de 100 µl de DMEM y SBF al 10% aprobado por Clontech, y se dejaron para que incubaran a temperatura ambiente durante al menos 2 horas. En ese momento, el medio se eliminó y se sustituyó por 100 µl de medio de bajo suero (DMEM, BSA al 0,2% y SBF al 1% aprobado por Clontech), que se complementó con 1 µg/ml de doxiciclina. Los pocillos de control negativo no se trataron con doxiciclina.
- 15 Al día siguiente, las sustancia candidatas se diluyeron según se requirió en una disolución que contenía BSA al 0,2%, HEPES 10 mM y 1 µg/ml de doxiciclina. Una sustancia candidata se diluyó preparando primero una disolución madre 10 mM de la sustancia en DMSO al 100%. Entonces, 5 µl de esa disolución se añadieron a 15 µl de DMSO para preparar una disolución 2,5 mM (50X concentración). Entonces, 6 µl de esta disolución final se transfirieron a un pocillo de una placa de polipropileno a la que se añadieron 300 µl de medio. Entonces, 100 µl de la disolución en el pocillo se añadieron a cada pocillo que contenía células, eliminando el medio que recubría las células, y se añadió cuidadosamente la disolución que contenía las diluciones de la sustancia candidata.
- 20 Entonces se preparó disolución HNTG^{plus} fresca añadiendo 1 comprimido de la mezcla de inhibidores de proteasa "complete mini" (Roche) a 10 ml agua, 200 µl de β-glicerofosfato (concentración final, 1 M), 100 µl de NaF (concentración final, 1 M) y 10 µl de Na₃VO₄ (concentración final, 1 M) y se mantuvo sobre hielo. Después de incubarse las células durante 3 horas con la sustancia candidata diluida, el medio se eliminó y la placa se transfirió a hielo. Entonces se añadieron 100 µl de disolución HNTG^{plus} fresca a cada pocillo que contenía células y se agitaron en una habitación fría durante 10 minutos. Durante este tiempo, el BSA de las placas de ELISA se separó con pipeta y se lavó dos veces con TBST.
- 25 Entonces, 50 µl del lisado celular se transfirieron de la placa de cultivo de tejido a un pocillo lavado de la placa de ELISA y se agitaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Entonces, el lisado celular se eliminó y los pocillos de la placa de ELISA se lavaron tres veces con TBST. Entonces, 100 µl de anticuerpo dirigido contra PGEF recientemente diluido (1:5000) se transfirieron a cada pocillo de la placa de ELISA y se agitaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. La disolución de anticuerpo se eliminó y los pocillos se lavaron cuatro veces con TBST. Entonces, 100 µl de HRP-GaR recientemente diluido (1:10.000) se añadieron a cada pocillo de la placa de ELISA y se agitaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Entonces, esta disolución se eliminó y los pocillos se lavaron cuatro veces con TBST, seguido de un lavado con PBS. Entonces se añadió disolución de ABTS a la placa a 100 µl por pocillo. Entonces, la placa de ELISA se incubó a temperatura ambiente y se agitó durante entre 10 y 20 minutos.
- 30 Después de este tiempo, la placa de ELISA se colocó sobre un lector de placas Tecan Sunrise y las mediciones se registraron usando un filtro de medición a 405 nm con un filtro de referencia de 620 nm.

Ejemplo 15

Medición de la actividad de cinasa *in vitro* de PAK4 humana usando un ensayo de proximidad de centelleo

- 45 El ensayo de proximidad de centelleo (SPA) se usa para analizar la actividad de la proteína serina/treonina cinasa PAK4 *in vitro*. El protocolo implicó añadir 10 µl de disolución de inhibidor a cada pocillo de una placa Flexi (placa "flexi") de poli(tereftalato de etileno) de 96 pocillos de Wallac, nº de cat. 1450-401) usando 10 µl de DMSO al 5% para controles positivos y negativos.
- 50 La enzima PAK4 se añadió a los pocillos de la placa flexi a concentraciones que se determinaron empíricamente. La enzima PAK4 se purificó a partir de células BL21. En el momento de este experimento, la concentración de la enzima cinasa PAK4 añadida a los pocillos fue 0,1 µg por pocillo en un volumen de 20 µl. La concentración variará con diversas preparaciones de enzima. Por consiguiente, el experto sabría cómo valorar la preparación de enzima y determinaría un periodo de tiempo de actividad de la cinasa lineal para preparaciones particulares de la cinasa. Se añaden 20 µl de EDTA 0,5 M a los pocillos de control negativo. El sustrato fue un péptido de PAK4 que se sabe que

está fosforilado por la enzima PAK que consiste en la estructura biotina-LC-LC-RRKSLVG(pT)PYWMAPE (SEC ID N°: 19)

El octavo aminoácido del péptido de PAK4, treonina, era una fosfotreonina, y el péptido completo se disolvió en agua a una concentración final de 5 mg/ml y se guardó a -80°C en alícuotas de 100 µl hasta que se necesitara. Sin embargo, la invención contempla que como sustrato puede usarse cualquier péptido que se cree que está o que está fosforilado por cinasa PAK (por ejemplo, PAK4) en lugar del péptido de PAK4. Por ejemplo, los péptidos de GEF-H1S representados por SEC ID N°: 3 y 4 pueden usarse como sustrato de PAK4.

Se usó 2,5 X tampón cinasa para facilitar la actividad de la cinasa PAK4 y contuvo concentraciones de trabajo por pocillo de HEPES 50 mM (pH 7,4), 12,5 mM de MgCl₂, KCl 375 mM y NaF 2,5 mM. Normalmente, 10 ml de cinasa tampón son suficientes para aproximadamente 4,5 placas de reacciones. Las concentraciones finales de estos constituyentes, tras las adiciones de sustancia candidata y ATP, son HEPES 20 mM (pH 7,4), MgCl₂ 5 mM, KCl 150 mM y NaF 1,0 mM.

Para empezar la reacción de cinasa se añadieron 20 µl de disolución de péptido biotinilado de PAK4/ATP a los pocillos de la placa y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, sin agitación, y se colocaron detrás de un escudo reactivo. La disolución de péptido/ATP que contenía concentraciones de trabajo (es decir, concentraciones por pocillo) de ATP frío 1,4 µM (es decir, no radiactivo), 0,1 µg por pocillo de Paktide y 0,33 µCi por pocillo de ³³P-ATP radiomarcado (NEN Easy-Tide, n° de cat. NEG602H). Después de 30 minutos se añadieron 200 µl de disolución de parada a cada pocillo y la placa se dejó reposar durante al menos 15 minutos. La disolución de "parada" que contuvo concentraciones de trabajo por pocillo de ATP 50 µM (sin marcar), EDTA 5 mM, Triton X-100 al 0,1 % y 0,5 mg de perlas SPA se preparó en disolución de tampón PBS. La PBS (solución salina tamponada con fosfato Dulbecco) sin magnesio ni calcio se obtuvo de Gibco BRL (n° de cat. 14190-144). Las perlas se obtuvieron de Amersham (perlas SPA de poliviniltolueno recubiertas con estreptavidina de Amersham, n° de cat. NSI 1077). Las perlas se reconstituyeron en PBS sin magnesio ni calcio a una concentración de disolución madre de 20 mg/ml y se guardaron a 4°C.

Entonces, la placa se centrifugó/se hizo girar a 2300 rpm durante entre 10 y 15 minutos y luego se transfirió a un lector de placas Trilux y los recuentos de radiactividad se registraron en consecuencia.

Ejemplo 17

Inducción del elemento de respuesta a suero

La activación de los factores de transcripción que convergen en el elemento de respuesta a suero (SRE) puede atribuirse a la activación de Ras que se observa en hasta el 50% de los carcinomas de colon humanos. Véase Gauthier-Rouviere y col., Embo J., 9(1):171-80, 1990.

La señalización de SRE por GEF-H1S y la actividad de PAK4 en la dirección 3' de proteínas Ras y Rho se determinó usando un sistema de vector pSRE-SEAP (Clontech, EE.UU.). Este ensayo se realizó en células NIH-3T3 usando procedimientos de transfección convencionales. El alelo de GEF-H1S inactivo, QR312,313MG, redujo los niveles de Rac Rho GTPasa activada en células estimuladas. Véase Taylor y col., Methods Enzymol., 333:333-42, 2001.

Además, la señalización de SRE se reduce casi hasta niveles basales por la expresión transitoria del alelo mutante inactivo GEF-H1S QR312,313MG y el mutante de fosforilación S810A.

Ejemplo 18

Cambios morfológicos mediados por alelos de GEF-H1

Para analizar el efecto de GEF-H1 sobre la morfología celular en fibroblastos, las construcciones de fusión de EGFP (proteína verde fluorescente potenciada) de GEF-H1S y una serie de alelos mutantes de los sitios de fosforilación de PAK4 en GEF-H1S se transfectaron en células NIH-3T3. También se construyó un alelo negativo dominante preparado mutando el dominio DH de GEF-H1 que produjo el mutante, GEF-H-QR312,313MG. En un ensayo de dominio de unión a p21 (PBD), este alelo negativo dominante inhibió la acumulación de Rac-GTP, pero no de Cdc42-GTP en células NIH-3T3. El citoesqueleto de actina se tiñó con cumarina-faloidina para contrastar estructuras de F-actina de células fluorescentes por EGFP por microscopía.

Se encontró que GEF-H1S natural se localizó normalmente en la región perinuclear y las células aparecieron alargadas con fibras de tensión ocasionales. Por el contrario, la expresión en exceso de GEF-H1S-S810A solo conduce a una acumulación y matriz desorganizada de fibras de tensión en comparación con células no transfectadas. La inducción de fibras de tensión es sorprendente dados los efectos relativamente modestos sobre el citoesqueleto de actina tras la expresión de alelos de GEF-H1S o PAK4 naturales solos. La morfología de GEF-H1S-S67A que expresa células fue similar a la morfología de células que expresan el mutante de DH de GEF-H1S negativo dominante.

La expresión del mutante del dominio DH GEF-H1S-QR312,313MG crea una cola de extensiones citoplásmicas

naturalmente distribuidas. La inducción de fibras de tensión en el caso de GEF-H1S-S810A recuerda a la activación de Rho, mientras que las extensiones citoplásmicas desorganizadas observadas con GEF-H1-Q312R,M313G y GEF-H1S-S67A podrían ser restos de colas de células no replegadas que pueden ser debidas a la inhibición de Rho.

5 Los cambios en la localización y el citoesqueleto de actina son especialmente espectaculares en el mutante doble de GEF-H1S-(S67A-S810A). Los agregados citoplásmicos de F-actina se encontraron en células que expresan EGFP-GEF-H1S (S67AS810A), además de laminillas de arco ancho carentes de F-actina. La redistribución de las proteínas mutantes del sitio de fosforilación y la acumulación inapropiada de F-actina citoplásmica apoya la idea de que la localización es crítica para la capacidad de GEF-H1 para estimular fibras de tensión.

Ejemplo 19

10 PAK4 activada y GEF-H1S (GEF-H1b) inducen la formación de lamelipodios en células NIH-3T3

15 La inducción de estructuras de F-actina en fibroblastos, concretamente la formación de filopodios, lamelipodios y fibras de tensión, es debida a una señalización por las formas activas de Cdc42, Rac y Rho, respectivamente. Las proteínas PAK, especialmente PAK4, desempeñan una función en la regulación de las estructuras morfológicas basadas en F-actina. Por consiguiente, se investigaron los cambios inducidos por PAK4 en la morfología celular mediados por la regulación de GEF-H1S. Las construcciones de EGFP-GEF-H1 se coexpresaron con diversos alelos de PAK4 marcados con el epítipo HA en células NIH-3T3. La PAK4 exógena se detectó con un anticuerpo dirigido contra HA y el citoesqueleto de actina se tiñó con cumarina-faloidina. Aunque las células NIH-3T3 tienen niveles de PAK4 y GEF-H1 endógenos bajos, pero detectables, éstos no se activaron en las condiciones del experimento.

20 Empleando diversos alelos de PAK4 fue posible confirmar qué efectos morfológicos fueron accionados por la fosforilación de PAK4 de GEF-H1. La coexpresión de los alelos de PAK4 con el control de EGFP produjo efectos relativamente modestos sobre la formación de estructuras basadas en F-actina en células NIH-3T3. En células que coexpresan PAK4 natural junto con GEF-H1S natural los inventores observaron un espectacular aumento en filopodios a diferencia de tanto PAK4 como GEF-H1S expresados solos. Pareció que las estructuras de filopodios eran dependientes de la menor actividad del alelo de PAK4 natural y la interacción con GEF-H1S ya que no se observaron cuando la proteína se expresó tanto en células solas como en controles contransfectados por vectores. En células que coexpresan la PAK4 S474E activada y GEF-H1S, estas estructuras produjeron la transición de filopodios a lamelipodios en el borde de ataque. No se observaron ni filopodios ni lamelipodios cuando GEF-H1S (GEF-H1b) se transfectó junto con la cinasa inactiva PAK4 K350,351 A. Sin embargo, las fibras de tensión estaban ahora abundantemente presentes. Considerado junto con el análisis de los mutantes de sitios de fosforilación de PAK4 en GEF-H1S, esto sugiere que la actividad de la cinasa PAK4 es responsable de la transición a la formación de lamelipodios.

35 Para confirmar si la formación de estas estructuras depende o no de la capacidad de PAK4 para fosforilar GEF-H1S se utilizaron mutantes de sitios de fosforilación de GEF-H1S. La cotransfección de un alelo de GEF-H1S-S810A mutante junto con PAK4 S474E muestra una profusión de tensión. Esto, junto con el resultado del alelo sin actividad de cinasa, dio lugar a la hipótesis que de la fosforilación de Ser 810 es responsable de tanto las señales que conducen a la formación de lamelipodios como de la inhibición de la formación de fibras de tensión en fibroblastos. Adicionalmente, PAK4 S474E y GEF-H1S-S810A se localizaron en distintos sitios periféricos que recuerdan a los sitios de unión de adhesión a células que sirven de puntos de nucleación para fibras de tensión de actina. Este tipo de localización de GEF-H1 también se ha observado en células HeLa. A diferencia de los efectos observados por la mutación de S810, la coexpresión de GEF-H1S-S67 A mutante con PAK4-S474E activada permite la formación dependiente de GEF-H1 de lamelipodios, a la vez que se evita la formación de fibras de tensión.

40 La actividad de intercambio de GEF-H1 se logra mediante la interacción del dominio de homología de Dbl (DH) con las Rac o Rho GTPasas en su estado inactivo. Para determinar si los efectos mediados por GEF-H1S accionados por la fosforilación de PAK4 son dependientes o no de la actividad de intercambio de GEF-H1S se examinaron células NIH-3T3 que coexpresan el mutante de DH negativo dominante de GEF-H1S (Q312M,R313G) con diversos alelos de PAK4. Por consiguiente, se observaron laminillas de arco ancho que carecían de actina, que es una diferencia de los lamelipodios ricos en actina o fibras de tensión formadas en presencia de alelos activos de GEF-H1S y PAK4 activada. El resultado confirma que las señales de PAK4 se retransmiten directamente por las actividades de intercambio de GEF-H1. Un estudio previo de GEF-H1 mostró la inducción de lamelipodios constitutivos en células Cos-7 mediante la expresión en exceso de GEF-H114.

TABLA 1

Alelo de GEF-H1	Tipo	Morfología celular	F-actina	Microtúbulo
GEF-H1S	natural (carece de DC*)	polarizada	fibras de tensión ocasionales	matriz radial
GEF-H1S810A	fosforilación	no polarizada	profusión de fibras de tensión	desorganizado
GEF-H1S Q312M.R313G	mutante de intercambio	no polarizada	protuberancias citoplásmicas / sin estructuras de actina / colas sin replegar	desorganizado
GEF-H1S S67A	fosforilación	no polarizada	protuberancias citoplásmicas / sin estructuras de actina	matriz concéntrica / perinuclear
GEF-H1S S67.810A	fosforilación	polarizada	agregados citoplásmicos	matriz radial
GEF-H1M	natural	polarizada	halo de fibras de tensión	radial/membrana concéntrica
Descripción de morfologías para cada alelo de GEF-H1 observado en la mayoría de células transfectadas. DC* =dedo de cinc.				

TABLA 2

Alelo de GEF-H1	Alelo de PAK4	Morfología celular	F-actina	Microtúbulo
GEF-H1S	PAK4	contraída	filopodios extremos	matriz radial
GEF-H1S	PAK4 S474E	polarizada	lamelipodios periféricos	desorganizado
GEF-H1S	PAK4 K350,351A	alargada	fibras de tensión	matriz radial
GFF-H1S310A	PAK4S474E	no polarizada	fibras de tensión	desorganizado

Alelo de GEF-H1	Alelo de PAK4	Morfología celular	F-actina	Microtúbulo
GEF-H1S67A	PAK4 S474E	no polarizada	lamelipodios distribuidos	matriz concéntrica / perinuclear
GEF-H1S Q312M,R313G	PAK4 S474E	no polarizada	laminilla de arco ancho que carece de actina	desorganizado
GEF-H1M	PAK4	polarizada	fibras de tensión ocasionales	radial
GEF-H1M	PAK4 S474E	no polarizada	lamelipodios periféricos	desorganizado
GEF-H1M*	PAK4 X350,351A	polarizada	fibras de tensión	radial
Morfologías típicas que se producen a partir de la mayoría de células que se coexpresan *datos no mostrados				

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica el polipéptido expuesto en una cualquiera de SEC ID N°: 2, 3 ó 4.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1.
- 5 3. Un polipéptido de GEF-H1b aislado que comprende la secuencia de SEC ID N°: 2.
4. El polipéptido de la reivindicación 3, en el que el polipéptido carece de los residuos de aminoácidos entre 162 y 354 de SEC ID N°: 2.
5. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3 ó 4.
- 10 6. El polipéptido o péptido según la reivindicación 3 ó 5, en el que el polipéptido o péptido comprende al menos un aminoácido fosforilado.
7. Un complejo de GEF-H1b/PAK4 aislado, en el que GEF-H1b comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2.
- 15 8. Un procedimiento para detectar actividad de PAK4 en una muestra que comprende detectar la presencia o el nivel de GEF-H1 fosforilado, en el que la detección de GEF-H1b fosforilado indica la presencia de al menos una PAK4 activa, y en el que dicho GEF-H1b comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de SEC ID N°: 2, 3 ó 4.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha PAK4 está en una célula.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha célula es una célula tumoral.
- 20 11. Un procedimiento de identificación de una sustancia que modula la interacción entre PAK4 y el polipéptido de GEF-H1b que comprende: (a) exponer el polipéptido de GEF-H1b a una sustancia candidata para formar una mezcla y luego (b) introducir en dicha mezcla una enzima PAK4; y (c) medir la cantidad de polipéptido de GEF-H1b fosforilado antes y después de exponer dicho polipéptido de GEF-H1b a dicha sustancia candidata, en el que una disminución o un aumento en la cantidad de polipéptido de GEF-H1b fosforilado después de la exposición a dicha sustancia candidata indica que dicha sustancia candidata es una sustancia que modula la interacción entre PAK4 y el polipéptido de GEF-H1b, en el que dicho polipéptido de GEF-H1b comprende la secuencia de una cualquiera de SEC ID N°: 2, 3 ó 4.
- 25 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que en (a) PAK4 se expone a una sustancia candidata y en (b) un polipéptido de GEF-H1b se introduce en la mezcla.
13. El procedimiento de la reivindicación 11 ó 12, en el que dicho polipéptido de GEF-H1b tiene la secuencia de una cualquiera de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4.
- 30 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la etapa de determinar si GEF-H1b se fosforila en la etapa (c) se realiza usando un anticuerpo específico para GEF-H1b dirigido contra un péptido que comprende al menos una de serina-810 fosforilada de SEC ID N°: 2 o serina-67 fosforilada de SEC ID N°: 2 para detectar GEF-H1 fosforilado.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que dicha sustancia candidata produce una disminución en la fosforilación total de GEF-H1b.
- 35 16. Un anticuerpo específico para GEF-H1b dirigido contra la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4.
17. El anticuerpo específico para GEF-H1b de la reivindicación 16, en el que dicha secuencia de aminoácidos comprende una serina fosforilada.
- 40 18. El anticuerpo específico para GEF-H1b de la reivindicación 17, en el que dicha serina fosforilada es serina-810 o serina-67 de GEF-H1b de longitud completa expuesta en SEC ID N°: 2.
19. Un procedimiento para identificar una sustancia que modula la interacción entre PAK4 y GEF-H1b que comprende (i) poner en contacto una sustancia candidata con un complejo de GEF-H1b-PAK4 y luego (ii) determinar si dicha sustancia perturba dicho complejo, en el que dicho GEF-H1b comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2.
- 45 20. Un procedimiento para determinar la presencia de PAK4 activada en una muestra de células que comprende (i) obtener el lisado celular de una muestra de células; (ii) aislar y/o separar proteínas de la preparación de lisado celular; y (iii) detectar la presencia de fosfovariantes de GEF-H1b, en el que GEF-H1b comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en SEC ID N°: 2, y en el que la detección de que la serina-810 o la serina-67 de GEF-H1b está fosforilada indica que dicha muestra de células comprende PAK4 activada.

- 5 21. Un procedimiento para cribar un fármaco que inhibe la actividad de la cinasa PAK4 que comprende (i) obtener el lisado celular de una muestra de células, (ii) aplicar a dicho lisado un fármaco candidato; (iii) aislar y/o separar proteínas de dicha preparación de lisado celular; y (iv) detectar la presencia de fosfovariantes de GEF-H1b, en el que GEF-H1b comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 2, y en el que la detección de que la serina-810 o la serina-67 de GEF-H1b está fosforilada indica que dicho fármaco no inhibe la actividad de la cinasa PAK4.
- 10 22. El procedimiento de cualquier reivindicación 20 ó 21, en el que dicha muestra de células es una muestra de células tumorales.
- 15 23. Un procedimiento *in vitro* para detectar proliferación celular, motilidad celular e/o invasión celular en un mamífero que comprende monitorizar en el momento de tiempo A y al menos otro momento de tiempo B el nivel de fosforilación de GEF-H1b en una muestra tomada de dicho mamífero, en el que un aumento en el nivel de fosforilación de GEF-H1b en dicha muestra entre dichos momentos de tiempo es indicativo de proliferación celular, motilidad celular y/o invasión celular, en el que dicho GEF-H1b comprende la secuencia de SEC ID N°: 2.
24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que dicha muestra es una muestra de dicha piel, sangre o células de mamífero.
25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dichas células son células tumorales.
- 20 26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 23-25, en el que dicho mamífero se selecciona del grupo que consiste en un ser humano, rata, ratón, perro, conejo, cerdo, oveja, vaca, caballo, gato, primate, cabra o mono.
27. Un vector que comprende el polinucleótido de cualquier reivindicación 1 ó 2.
28. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 27.
- 25 29. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21.
- 30 30. Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21.
31. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21.
- 30 32. Un procedimiento para identificar una molécula que perturba una interacción entre PAK4 y GEF-H1b que comprende: (a) exponer GEF-H1b a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 21, en el que dicho polipéptido se une a dicho GEF-H1b para formar un complejo; (b) añadir una o más moléculas de prueba a dicho complejo; y (c) determinar si dicho polipéptido y dicho GEF-H1b se disocian el uno del otro después de añadir dicha(s) molécula(s) de prueba a dicho complejo.

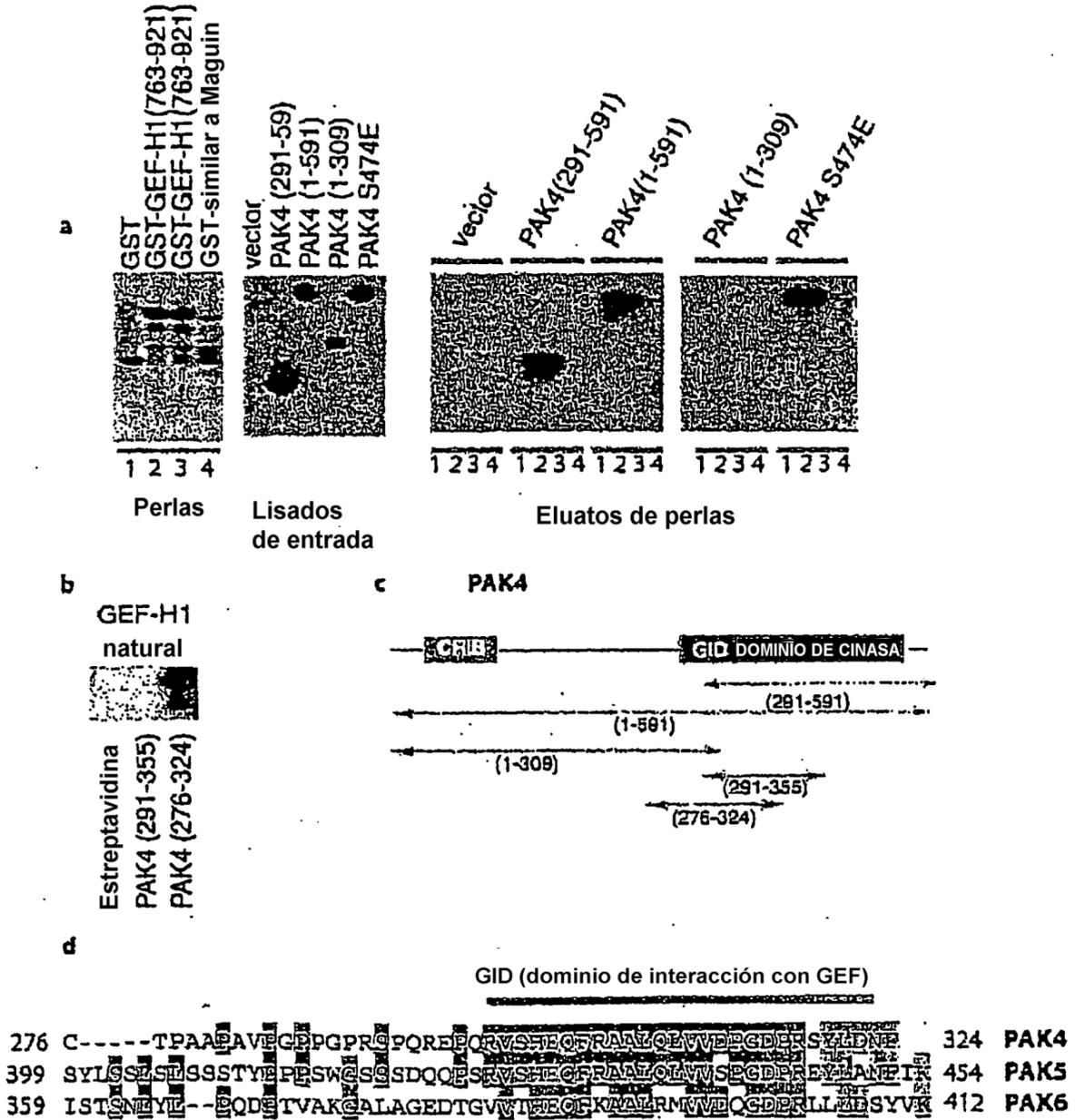


Fig. 1 Asociación *in vitro* de GEF-H1 con alelos y subdominios de PAK4

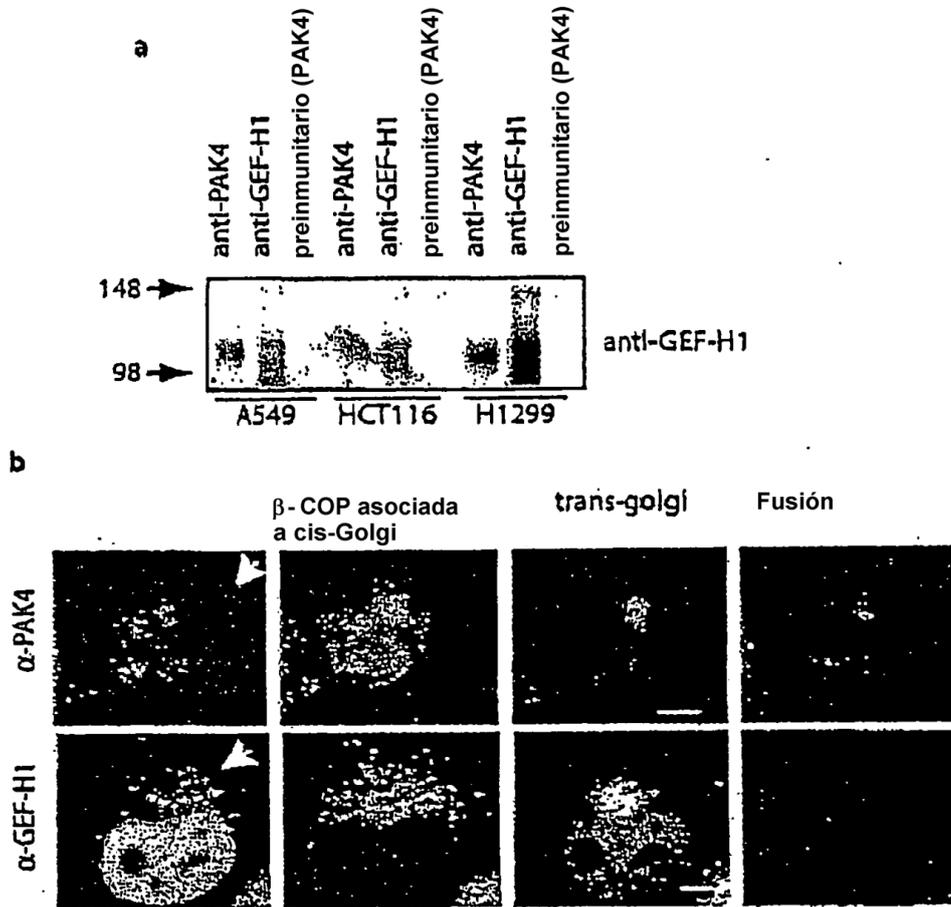


Fig. 2 Coasociados de PAK4 y GEF-H1

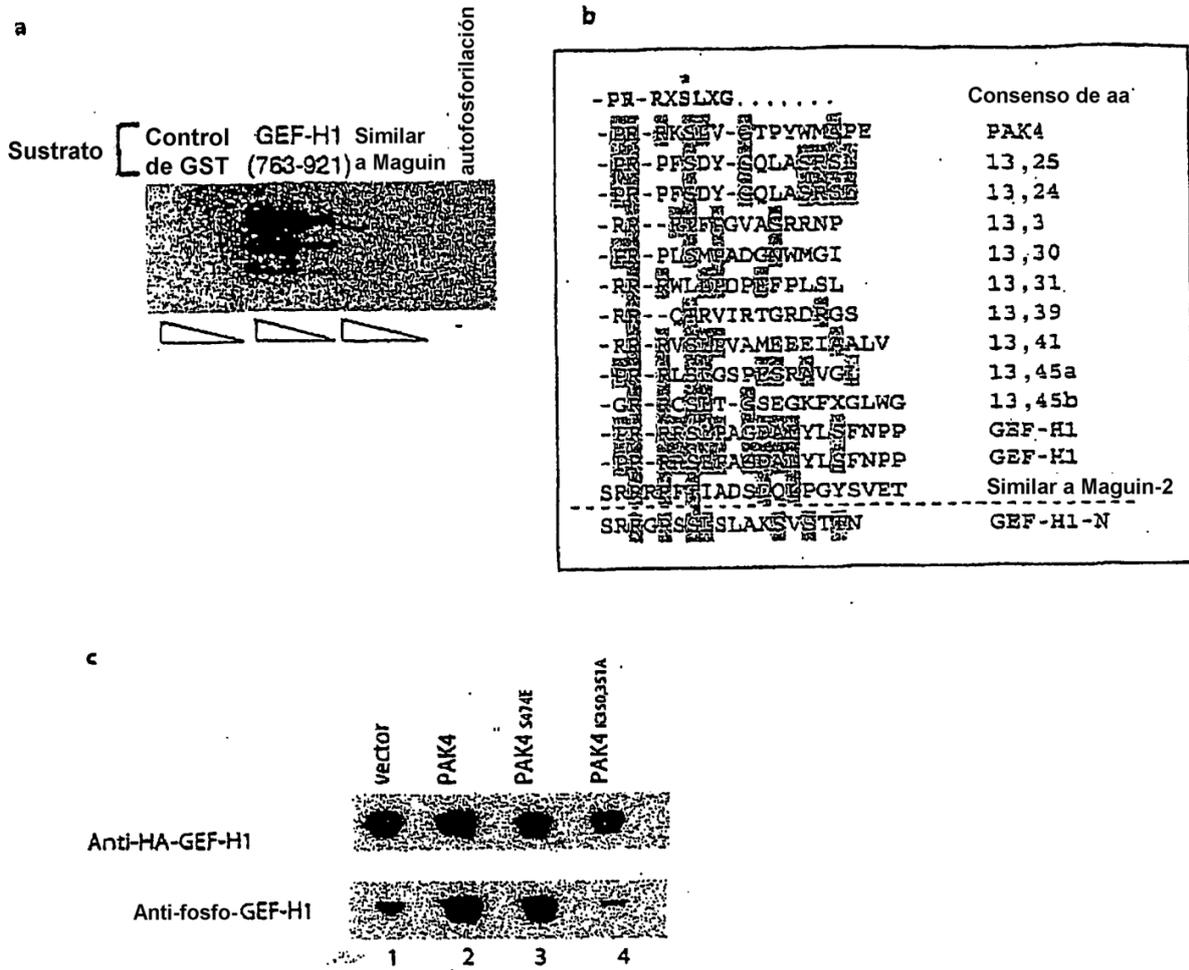


Fig. 3 PAK4 fosforila GEF-H1 *in vitro* e *in vivo*

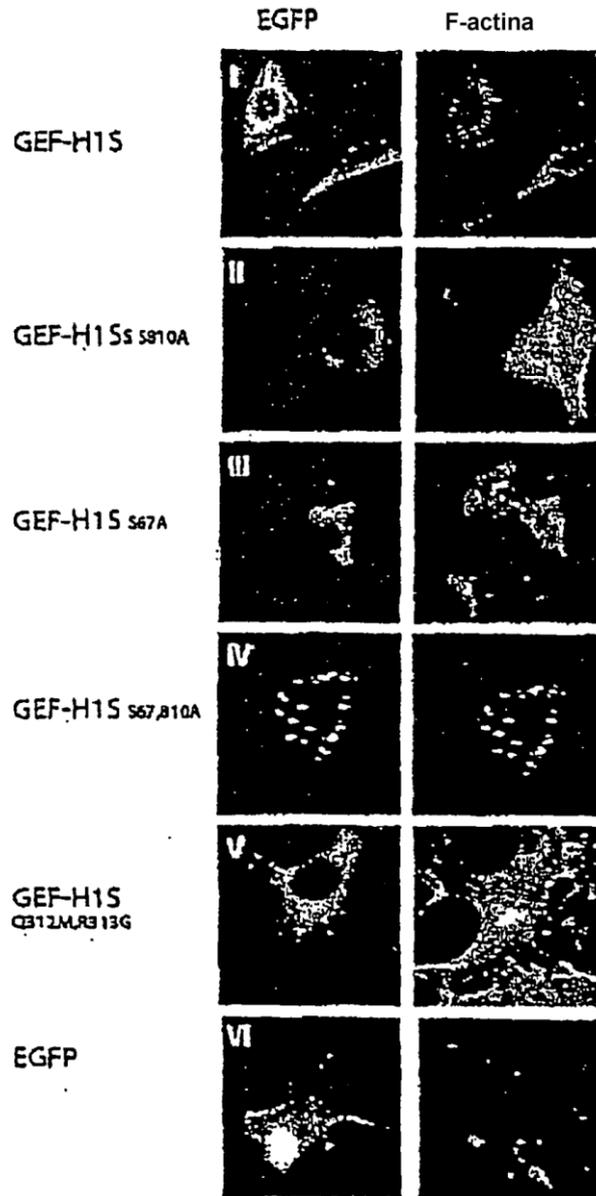


Fig. 4 Efectos morfológicos de alelos de GEF-H1

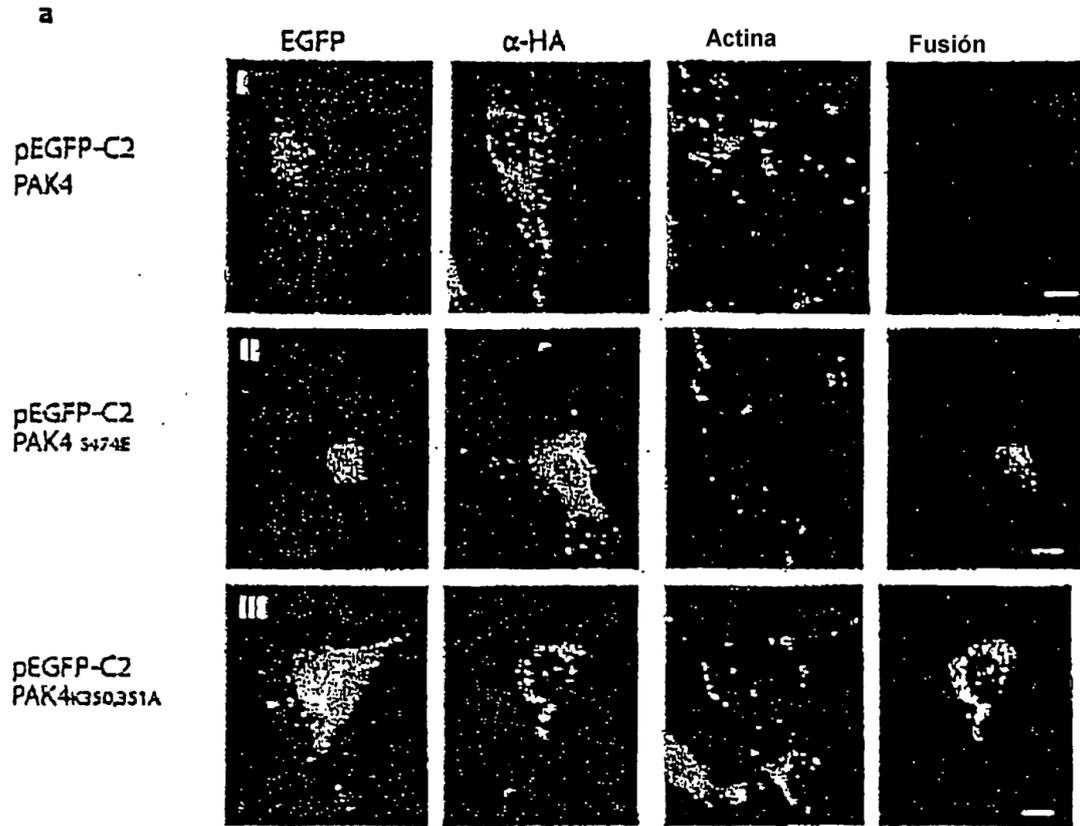


Fig. 5a Efectos PAK4 sobre el citoesqueleto de actina

b

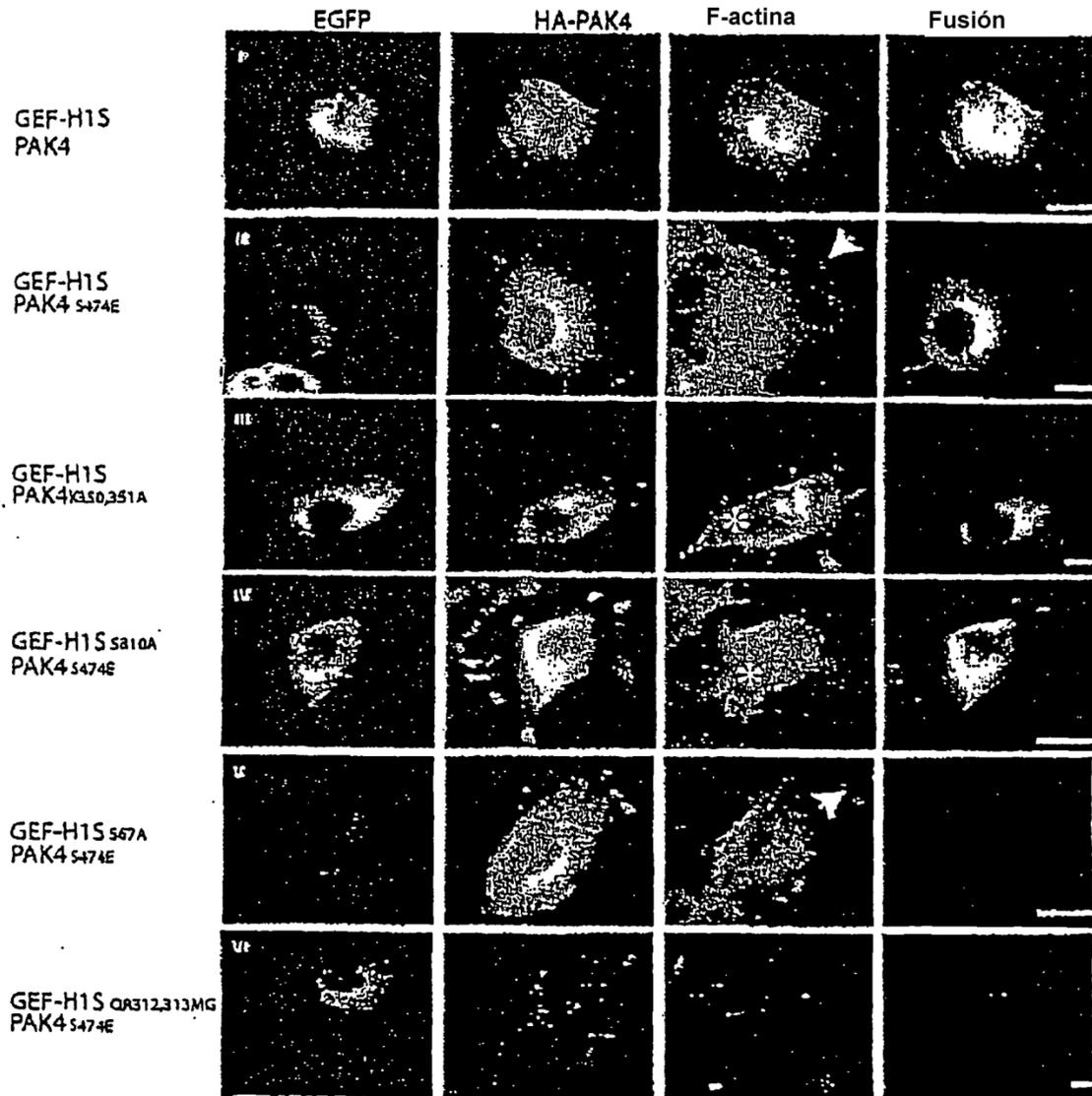


Fig. 5b PAK4 regula la formación de lamelipodios mediante la fosforilación de S810

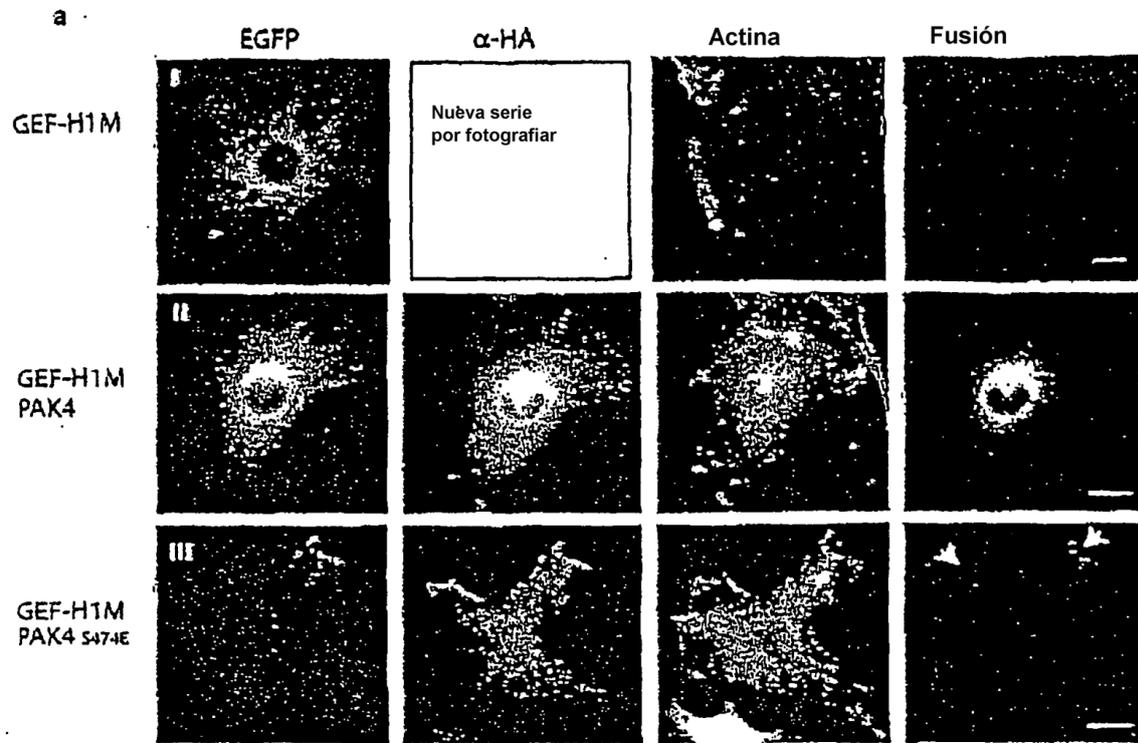


Fig. 6a Señalización de PAK4 a través de GEF-H1M para el citoesqueleto de actina

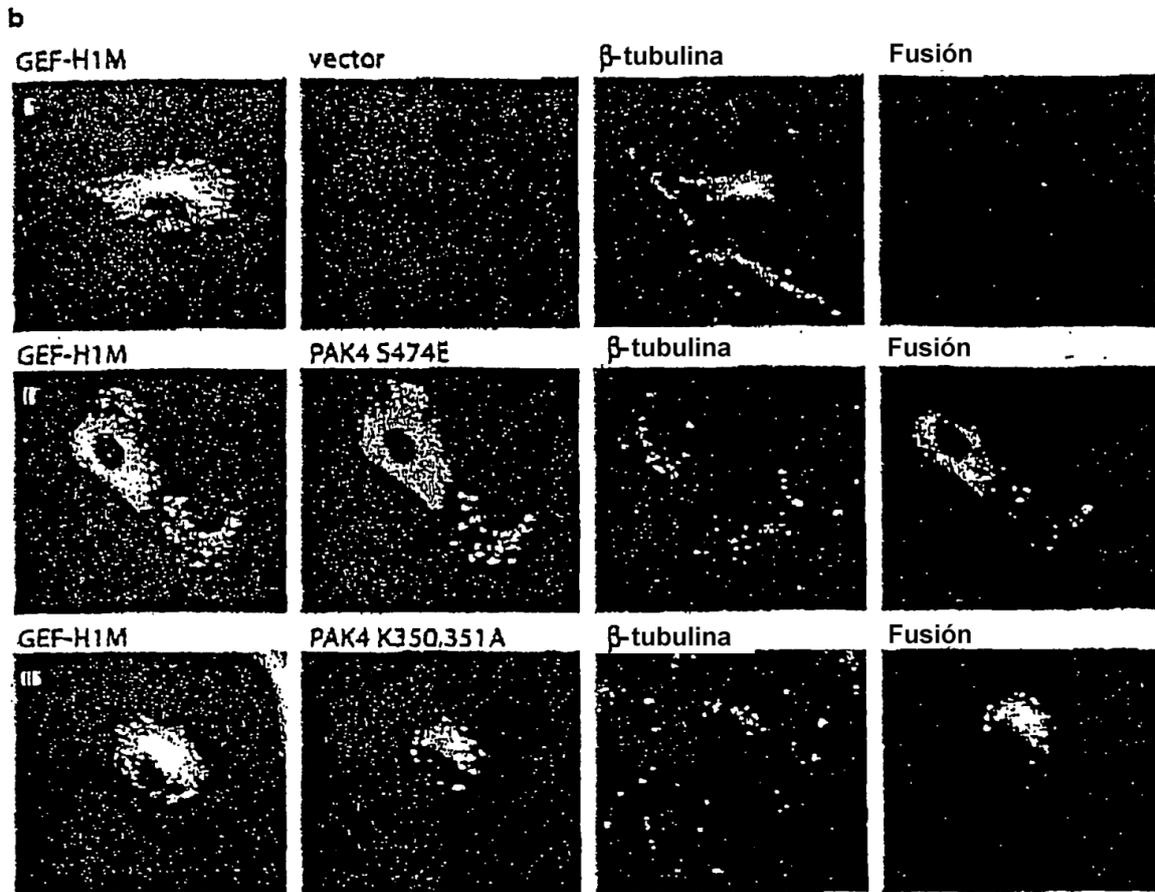


Fig. 6b La actividad de PAK4 desestabiliza la asociación de GEF-H1M a MT

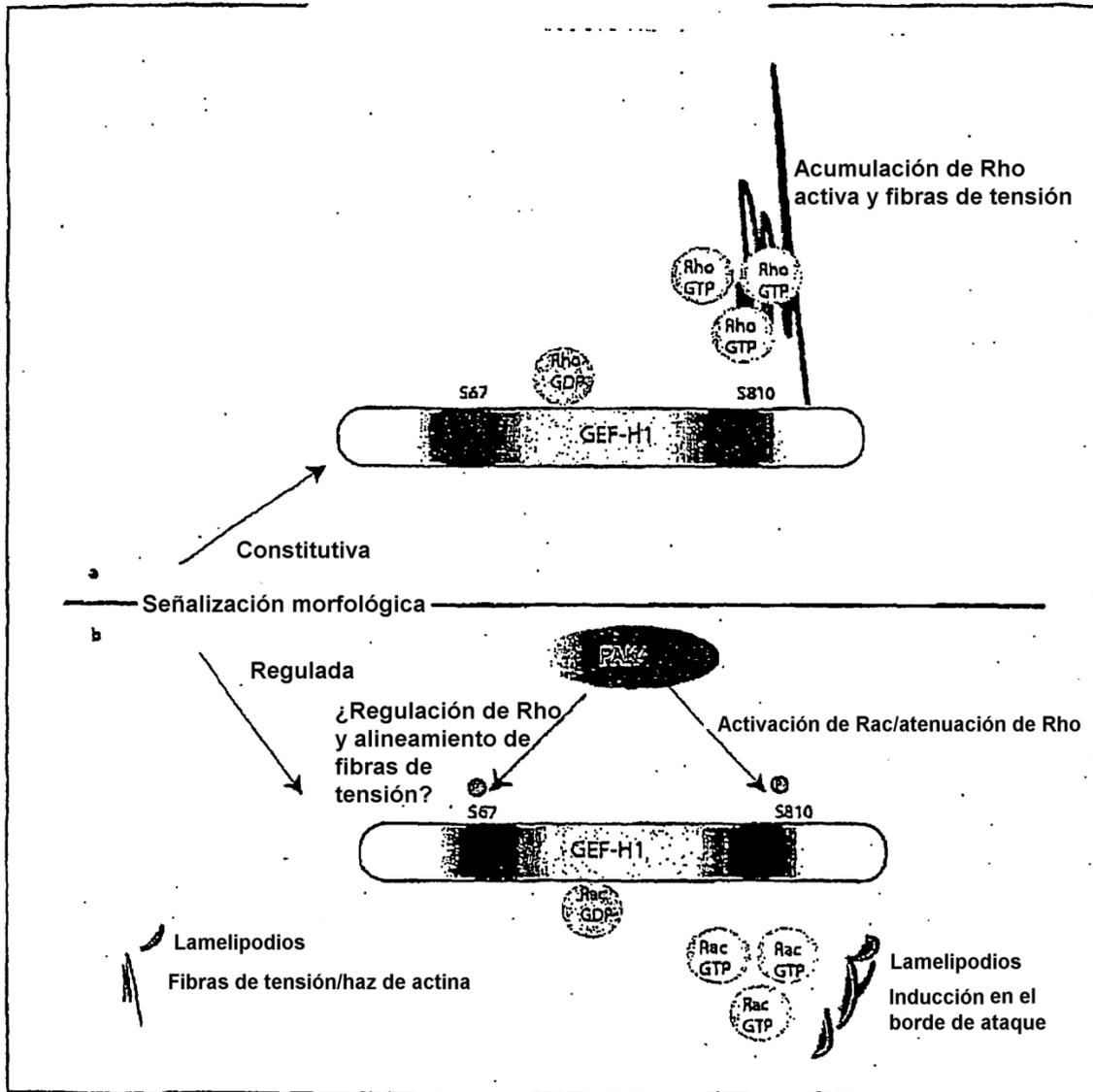


Fig. 7 Modelo para la regulación recíproca de Rac y Rho *in vivo*.

FIGURA 8 Puntuaciones de fosforilación de proteínas y péptidos de GEF-H1

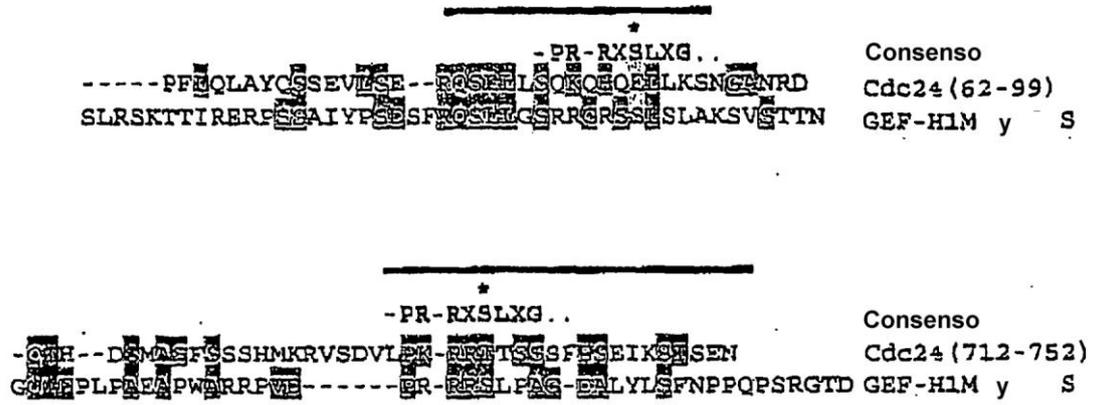
a.

	PÉPTIDO		FOSFORILACIÓN
681	RRKSLVGTPYWMAPE	PAK4 act loop	+++++
1008	RRRSLPAGDALYLSFNPP	GEFH1 (807-824)	+++++
1009	RRRSLPAGDALYLSFNPP	GEFH1 (807-824)	-
1010	RRRSLPAGDALYLSFNPP	GEFH1 (807-824)	+++++
1412	RQSLLGSRGRS SLSLAK	GEFH1 (55-72)	-
1413	RQSLLGSRGRS SLSLAK	GEFH1 (55-72)	-
1414	RQSLLGSRGRS SLSLAK	GEFH1 (55-72)	+++++

b.

POLIPÉPTIDO	FOSFORILACIÓN
1-386	++++
386-921	++
763-921	++++
51-921 ^{SB10A}	++++
386-921 ^{SB10A}	-
807-824	++++
55-72	++

FIGURA 9 Las regiones reguladoras de GEF-H1 están conservadas con Cdc24



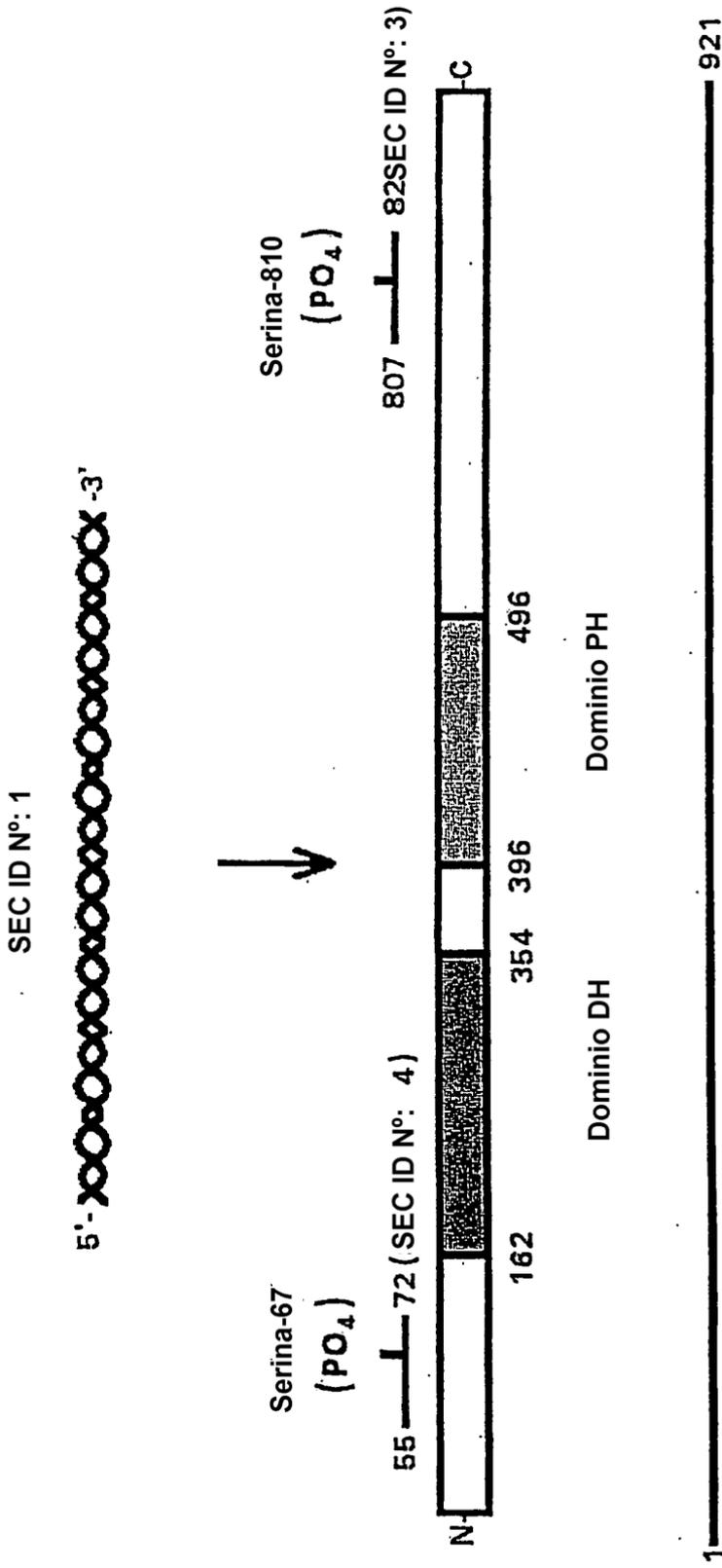


Figura 10