



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 198**

51 Int. Cl.:
C07K 14/82 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04743435 .2**
96 Fecha de presentación : **16.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1651673**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **Métodos para el uso de un complejo LKB1/STRAD/MO25.**

30 Prioridad: **17.07.2003 GB 0316725**
20.12.2003 GB 0330078

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **University of Dundee**
11 Perth Road
Dundee DD1 4HN, GB

72 Inventor/es: **Hardie, David, Grahame;**
Alessi, Dario y
Boudeau, Jerome

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para el uso de un complejo LKB1/STRAD/MO25.

La presente invención se refiere a las proteinocinasas y su regulación.

LKB1 es una proteinocinasa Ser/Tr no relacionada estrechamente a otras proteinocinasas (revisado en (Yoo *et al.*, 2002)). Se han ligado mutaciones en LKB1 al Síndrome del Cáncer de Peutz Jeghers (SPJ), un trastorno hereditario autosómico dominante (Hemminki *et al.*, 1998; Jenne *et al.*, 1998) caracterizado en aquéllos afectados por el desarrollo de pólipos hamartomatosos gastro-intestinales múltiples así como un espectro ancho de tumores benignos y malignos (Hemminki, 1999), con un riesgo aumentado 15 veces de desarrollar los cánceres malignos en muchos tejidos [20,21]. Hasta la fecha, casi 100 mutaciones diferentes en el gen LKB 1 se han identificado en pacientes de SPJ, la mayoría de los cuales se esperaba que dañe la actividad del LKB 1 [22]. La delección de ambos alelos del gen LKB 1 en ratones resulta en el letalidad embrionaria a medio gestación surgiendo múltiples defectos (Ylikorkala *et al.*, 2001), indicando que el LKB1 juega un papel esencial en el desarrollo. Pretenciosamente los ratones heterocigotos de LKB1 son viables pero desarrollan el SPJ similar a una enfermedad caracterizada por hamartomas gastrointestinales, aunque es polémico si éstos son causados por haploinsuficiencia o pérdida de heterocigosidad (revisado en [22]). Después en la vida (por ejemplo sobre 50 semanas de edad) estos animales también desarrollan tumores malignos, como el carcinoma hepatocelular, demostrándose que estaba asociado con la pérdida de expresión de LKB 1 (Bardeesy *et al.*, 2002; Jishage *et al.*, 2002; Miyoshi *et al.*, 2002; Nakau *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2002). La sobre expresión de LKB1 en ciertas células del cáncer resulta en el crecimiento de la supresión debido a la detención del ciclo de la célula de G1, el cual es dependiente de la actividad catalítica del LKB1 (Tiainen *et al.*, 1999) y esto se ha propuesto ser mediado a través de la activación de p21^{WAF1/CIP1} a través de un mecanismo dependiente-p53 (Tiainen *et al.*, 2002). Tomado juntos, estos resultados indican fuertemente que es probable que ese LKB1 funcione como un supresor del tumor. Trabajo reciente ha indicado que el *C. elegans* (Vatios *et al.*, 2000), Drosophila (Martin y St Johnston, 2003) y Xenopus (Ossipova *et al.*, 2003) homólogos del LKB1 regulan la polaridad celular y, si esta función se conserva en los humanos, la pérdida de polaridad celular en los pacientes de SPJ podría causar el desarrollo de hamartomas. Aunque LKB1 es esencialmente nuclear, cuando está sobre expresado en las células, también se observa frecuentemente un nivel bajo de localización citosólica (Karuman *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1999; Tiainen *et al.*, 1999). Significativamente, mutantes de LKB 1 que están excluidos del núcleo detienen la actividad de supresión de crecimiento completo, sugiriendo que la localización citoplasmática de esta enzima es importante para su función de supresor del tumor (Tiainen *et al.*, 2002). Se encontraron varias formas del mutante de LKB 1 en pacientes de SPJ localizadas solamente en el núcleo y no son detectables en el citoplasma (Boudeau *et al.*, 2003b; Tiainen *et al.*, 2002), haciendo pensar además que la localización citoplasmática del LKB1 es importante.

Se conoce relativamente poco sobre cómo el LKB1 se regula y cómo funciona. El LKB1 es fosforilado en múltiples residuos *en vivo* y la mutación de ciertos sitios de fosforilación obstaculiza la habilidad del LKB1 de suprimir el crecimiento celular, pero los mecanismos por los cuales estos eventos de fosforilación regulan la función del LKB1 no se han definido todavía (Collins *et al.*, 2000; Sapkota *et al.*, 2002a; Sapkota *et al.*, 2002b; Sapkota *et al.*, 2001). Ha habido también considerable interés en identificar las proteínas interactuando con el LKB1, las cuales pueden regular su función. Hasta la fecha, se han mostrado varias proteínas para ligarse al LKB1, a saber la proteína supresora del tumor p53 (Karuman *et al.*, 2001), el brama-relacionado a la proteína del gen 1 (Brg1) que es un componente de los complejos de remodelamiento de la cromatina (Marignani *et al.*, 2001), una proteína nombrada LKB 1 interactuando con la proteína-1 (LIP1) (Smith *et al.*, 2001) y el complejo acompañante específico del cinasa, que consiste en Cdc37 y Hsp90 (Boudeau *et al.*, 2003a). La liga de LKB 1 al p53 fue propuesta por ser esencial para mediar la muerte celular dependiente del p53 (Karuman *et al.*, 2001), mientras que la liga del LKB1 a Brg1 fue sugerida por ser requerida para la detención del crecimiento celular dependiente del Brg1 (Marignani *et al.*, 2001). La interacción de LKB 1 con el LIP 1 fijado al LKB 1 en el citoplasma (Smith *et al.*, 2001), mientras la liga del LKB 1 al Cdc37 y Hsp90 estabilizó la proteína del LKB 1 en las células (Boudeau *et al.*, 2003a).

Recientemente, nosotros hemos demostrado que el LKB 1 está asociado con una pseudo cinasa relacionada STE20 nombrada STRAD α (STE20-Relacionado Adaptador a la proteína- α), la cual carece de la actividad catalizadora porque los residuos importantes requeridos para la función de casi todas las proteinocinasas se están perdiendo (Baas *et al.*, 2003). Es más, LKB 1 liga STRAD α a través de su dominio catalizador y esta interacción refuerza LKB 1 en la actividad *en vivo* así como promoviendo la localización citoplasmática del LKB1 (Baas *et al.*, 2003). LKB1 no es capaz por mucho tiempo de suprimir el crecimiento celular en células en las cuales STRAD α ha sido agotado usando una aproximación del siRNA, sugiriendo que la liga de LKB1 a STRAD α juega un papel importante mediando su función de supresor del tumor. STRAD α también es fosforilado *en vitro* y *en vivo* por LKB1, haciendo a STRAD α el primer sustrato fisiológico para LKB1 identificado así lejos (Baas *et al.*, 2003).

La cinasa de proteinocinasa activada-AMP (AMPKK) y la proteinocinasa activada-AMP (AMPK) son los componentes contracorriente y a favor de una cascada de proteinocinasa que actúa como un sensor de la carga de energía celular [1,2]. AMPK se activa por una elevación, en celular 5'-AMP que siempre acompaña una caída en la proporción ATP:ADP debido a la reacción catalizada por el adenilato de cinasa (2ADP $\rightarrow$ ATP + ADP). Esto ocurre durante las tensiones metabólicas como la hipoxia, la isquemia, la suspensión de glucosa y, en el músculo del esqueleto y cardíaco, durante la contracción o el ejercicio [1-3]. Esto se aplica a ambas isoformas de las subunidades catalizadoras del AMPK (AMPK 1 y AMPK 2). Una vez activada por la tensión, el AMPK desvía la captación de glucosa y ácido graso y el metabolismo del óxido de estos combustibles para generar ATP, desconectando mientras las vías biosintéticas que

consumen ATP. Este cambio metabólico se logra tanto por la fosforilación directa de enzimas metabólicas como por los efectos un mayor tiempo sobre la expresión del gen [1,2]. El AMPK también se activa por la metformina, uno de los fármacos más ampliamente usados para la diabetes (aunque se requieren altas dosis, esto es >2g por día en los adultos), por un mecanismo desconocido que no involucra la disminución de los niveles celulares de ATP. La activación de AMPK tanto por el agotamiento del ATP como por la fenformina requiere la fosforilación de la subunidad catalizadora (α) del AMPK a su residuo del bucle T (Tr 172 en AMPK α 1) por una cinasa contracorriente. Mientras el AMPK es el mejor conocido por sus efectos sobre el metabolismo, el reciente trabajo sugiere que también se regule el crecimiento y la proliferación celular. Primeramente, la activación del cinasa inhibe la síntesis de la proteína por medio de causar la fosforilación de factor de alargamiento -2 [4], y la inhibición de la fosforilación del p70S6K por la vía del mTOR [5,6]. En segundo lugar, tiene en pro ambos efectos, los apoptóticos [7-9] y los anti-apoptóticos [10,11] en células diferentes. En tercer lugar, reduce el nivel del ARN de la proteína ligante HuR en el citoplasma, disminuyendo la estabilidad de mRNAs que pone en código los genes proliferativos como las ciclinas A y B1 [12]. Cuarto, inhibe la proliferación de las células de G2 Hep estabilizando el p53 [13].

En el documento WO 02/06520 se describe la inhibición específica de la vía de transducción señalada Ras/MEK/ERK por LKB1.

Un método para ensayar la actividad de LKB 1 se describe en el documento WO 2004/113 562.

La regulación de LKB1 y sus actividades conocidas se revisan en Boudeau *et al.* (Cartas de FEBS (2003) 546:159-165).

Nosotros tenemos con anterioridad parcialmente purificado del hígado de la rata al cinasa contracorriente, el AMPKK, que activa el AMPK por fosforilación, a Tr-172 dentro del bucle de activación del dominio del cinasa [14; Hawley *et al.* (J. Biol. Chem. (1996) 271: 27879-87)].

Sin embargo, nosotros hemos sido incapaces de purificar bastante material para obtener la secuencia del aminoácido e identificar la actividad como un producto del gen definido. Nosotros buscamos los cinasas contracorriente del *Saccharomyces cerevisiae* homólogo del AMPK (el complejo de SNF1), ensayando la habilidad de una colección de 119 levaduras fusiones de proteinocinasa-glutación-S-transferasa (GST) para activar cinasas del mamífero y de levadura. Esta aproximación identificó la proteinocinasa Elm1 como un cinasa contracorriente potencial [15]. Analizando las proteinocinasas que interactuaron con Snf1 por dos análisis híbridos, Schmidt y sus colegas identificaron el Pak1 como otro cinasa contracorriente potencial en la levadura [16]. Ni las tensiones de elm1 Δ ni de pak1 Δ en que solo los genes del cinasa fueron anulados, tenían el mismo fenotipo que la tensión del snf1 Δ . Sin embargo, Elm1 y Pak1 forman una pequeña sub-familia con la proteinocinasa Tos3, y la tensión de un mutante triple de elm1 Δ pak1 Δ tos3 Δ tenía el fenotipo similar al snf1 Δ que fue restaurado al tipo natural por la expresión de uno cualquiera de los tres cinasas [15]. Esto demostró que estas tres proteinocinasas actúan como los cinasas contracorriente para el complejo SNF1 de una manera parcialmente redundante.

Los parientes más cercanos de Elm1, Pak1 y Tos3 codificados por el genoma humano son la isoforma β del cinasa de proteinocinasa dependiente de calmodulina (CaMKK). Nosotros hemos mostrado previamente que un CaMKK purificado del cerebro del cerdo podía activar el AMPK en los ensayos de célula-libre, aunque bastante pobremente comparado con la activación de la proteinocinasa dependiente de calmodulina (CAMKI). Sin embargo, el AMPKK purificado previamente del hígado de la rata no fue dependiente de calmodulina [17]. Entre otro menos cercano relacionado a la familia de Elm1/Pak1/Tos3 en los humanos está el LKB 1 (vea la alineación en Fig. 1), un cinasa 50kDa del serina/treonina que se descubrió originalmente como el gen mutado en el desorden heredado del síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ) [18,19], como fue discutido anteriormente. Varias líneas celulares de tumores humanos, incluso las células de HeLa y G361 (melanoma), falta la expresión de LKB1 mRNA y proteína, y la expresión de tipo natural LKB1 en estas células causó una detención del crecimiento en la fase G1, mientras que la expresión de mutaciones catalíticamente inactivas de LKB1 o varias aisladas de las mutaciones de SPJ no detuvieron el crecimiento celular [23]. La detención del crecimiento inducido por la expresión de LKB1 en las células de G361 también fue informado para ser invertida por la coexpresión de las ciclinas D 1 o E, fue asociada con la inducción del transcripcional del inhibidor de cinasa p21WAF1/CIP1 ciclina-dependiente, y fue mostrado por ser dependiente en el p53 [24]. Tomados juntos, estos resultados muestran que LKB1 actúa como un supresor del tumor y que la actividad catalizadora de LKB1 es esencial para esta función. Sin embargo, el(los) sustrato(s) (a favor de la corriente) que LKB1 fosforila para mediar la supresión del crecimiento celular permaneció desconocido.

Nosotros identificamos MO25 α (RAtón proteína 25- α) como un nuevo componente del complejo LKB1-STRAD α y establece que MO25 α juega un papel importante en estabilizar este complejo en el citoplasma celular así como reforzando la actividad catalizadora de LKB 1. Para cada uno de STRAD α y MO25 α hay también una isoforma estrechamente relacionada (STRAD β y MO25 β) codificado en el genoma humano, que también puede asociarse con LKB1. Nosotros demostramos que MO25 puede funcionar como un componente del andamiaje del complejo de LKB1-STRAD. Aunque STRAD α [30] y STRAD β están relacionados a la proteinocinasa Ste20, algunos de los residuos esperados en un proteinocinasa activa no se conservan, y ellos son por consiguiente clasificados como "pseudocinasas". MO25 α (por ejemplo) liga al término C de, por ejemplo, STRAD α , y estabiliza la asociación entre STRAD α y LKB1. La asociación de LKB1 con STRAD y MO25 aumenta la actividad del cinasa contra un sustrato artificial (proteína básica de mielina) y también refuerza su localización citoplasmática, la cual fue previamente implicada en la función

supresora del tumor del LKB1, ya que mutantes carentes de una señal de localización nuclear aun eran capaces de suprimir el crecimiento celular [24].

Además, nosotros describimos la resolución del hígado de la rata de dos cinasas contracorriente (AMPKK1 y AMPKK2). Nosotros mostramos que ambas, AMPKK1 y AMPKK2, contienen el LKB1 acomplejado con STRAD α y MO25 α , y que ambas actividades son inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-KB1. Es más, ambos complejos LKB1/STRAD/MO25 endógeno y recombinantes aislados de las células del HEK-293T activan el AMPK por la vía de la fosforilación del Tr-172 en la subunidad α . Nosotros demostramos que la habilidad de LKB1 para fosforilar y activar el AMPK se refuerza dramáticamente por la presencia de las subunidades STRAD y MO25, sugiriendo que ambas subunidades son esenciales para la actividad máxima. Finalmente, los fármacos que activan el AMPK en otros tipos de célula (ribosida de AICA y fenformina), no activan el AMPK en células de HeLa que no expresan LKB1. Sin embargo, la expresión estable del LKB1 tipo natural pero no un mutante catalíticamente-inactivo, restauró la activación del AMPK, por estos fármacos. De acuerdo con esto, nosotros mostramos que el LKB1, en el complejo con STRAD y MO25, es el activador fisiológico del AMPK. Ahora es posible realizar los tamices para identificar los compuestos a fin de modular la activación fisiológica del AMPK.

Un primer aspecto de la invención provee un método para identificar un compuesto para el uso en modular, por ejemplo, promoviendo, la activación o fosforilación de AMPK (proteínocinasa activada-AMP) o AMPK miembro de subfamilia en una célula, el método que comprende los pasos de (1) determinar si un compuesto de la prueba modula, por ejemplo promueve, la actividad de la proteinocinasa del LKB1 y (2) seleccionar un compuesto que modula, por ejemplo promueve, la actividad de la proteinocinasa del LKB1, en donde el LKB1 está en una preparación con STRAD y MO25, en donde el MO25 es el recombinante y se expresa de un recombinante del ácido nucleico.

La actividad de la proteinocinasa del LKB1 que es modulada/evaluada en el método de exploración selectiva puede ser la fosforilación de un sustrato no-fisiológico como la proteína básica de mielina (por ejemplo como se discutió en los Ejemplos).

Alternativamente, la actividad de la proteinocinasa del LKB1 que es modulada/evaluada en el método de exploración selectiva puede ser la fosforilación del AMPK o un miembro de la subfamilia del AMPK, o un fragmento cualquiera de éste, como se discutió más adelante. La fosforilación del AMPK o de un miembro de la subfamilia del AMPK puede evaluarse midiendo la activación o fosforilación del AMPK o de un miembro de la subfamilia del AMPK, como se discutió más adelante debajo y en los Ejemplos. Por ejemplo, sustratos del péptido conveniente para LKB1 se discuten en el Ejemplo 3 y 4 e incluyen el péptido de bucle-NUAK2 T (nombrado LKBtido). La activación del AMPK (por ejemplo) puede evaluarse usando un gen reportero cuya expresión se modula por AMPK. Otras técnicas y reactivos que pueden ser útiles en medir la actividad de la proteinocinasa del LKB y/o fosforilación o activación del AMPK o un miembro de la subfamilia del AMPK (o fragmento de éste) se describen en los Ejemplos, por ejemplo en el Ejemplo 4.

La actividad de la proteinocinasa puede aumentarse o disminuirse por una alteración en el Vmax o el Km (o ambos) del LKB1 (o AMPK o miembro de la subfamilia, según sea apropiado) para un sustrato particular. Por ejemplo, la actividad puede aumentarse por un Vmax aumentado o Km disminuido. Se apreciará que puede no ser necesario determinar el valor de Vmax o Km para determinar si el LKB1 (o AMPK o miembro de la subfamilia, según sea apropiado) ha sido activado o desactivado. Se apreciará que el AMPK o miembro de la subfamilia defosforilado (desactivado) puede retener alguna actividad enzimática.

La actividad puede medirse como la cantidad de un sustrato fosforilado en un tiempo dado; por consiguiente, un cambio de actividad puede detectarse como un cambio en la cantidad de sustrato (por ejemplo, a una sola concentración) esto es el fosforilado en un tiempo dado. Se prefiere que la actividad se aumente o se disminuya, según sea apropiado, por lo menos 2, preferiblemente 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 50- veces.

Se apreciará que puede ser necesario determinar el efecto del compuesto en la actividad del sustrato (por ejemplo el AMPK), midiendo por ejemplo la actividad del sustrato cuando se expone al compuesto (1) después de la exposición del sustrato a LKB1, (2) antes de la exposición del sustrato a LKB1 y/o (3) sin la exposición a LKB1.

Puede medirse la expresión de una proteína codificada por un ARN transcrito desde un promotor regulado (directa o indirectamente) por un sustrato de LKB1 (o producción del propio ARN). La proteína puede ser una que es fisiológicamente regulada por un sustrato de LKB1, por ejemplo AMPK o miembro de la subfamilia, o puede ser una proteína del "reportero", también conocida, por los expertos en la técnica (por ejemplo, puede usarse una estructura del recombinante). Una proteína del reportero puede ser una cuya actividad puede fácilmente ensayarse, por ejemplo β -galactosidasa, acetiltransferasa o luciferasa del cloranfenicol (vea, por ejemplo, Tan *et al* (1996)).

La activación del AMPK, por ejemplo en el hígado, disminuye la expresión de las enzimas de la gluconeogénesis (fosfenoilpiruvato carboxilasa y glucosa-6-fosfatasa); vea Lochhead *et al*. 5-aminoimidazola-4-carboxamida ribosida mimicos de los efectos de la insulina en la expresión de los 2 genes gluconeogénicos importantes del PEPCK y glucosa-6-fosfatasa. Diabetes. 2000 Jun; 49(6):896-903; Yamauchi *et al* La adiponectina estimula la utilización de glucosa y la oxidación del ácido graso mediante la activación de la proteinocinasa activada-AMP. Nat Med. 2002 Nov; 8(11):1288-95. Otra clase de genes que apagados por el AMPK, por ejemplo en el hígado, son aquellos que ponen en código las enzimas de la biosíntesis del ácido graso (sintasa del ácido graso y AcetilCoA carboxilasa); Vea Woods

et al. Caracterización del papel de la proteinocinasa activada-AMP en la regulación de la expresión del gen activado por glucosa que usa formas negativas activas y dominantes del cinasa constitutivamente. *Mol Cell Biol.* 2000 Sep; 20 (18):6704-11. La activación del AMPK también reduce el nivel de 4 factores de la transcripción: elemento respuesta del esteroide que liga la proteína-1C (Zhou *et al.* Papel de la proteinocinasa activada-AMP en el mecanismo de acción de la metformina. *J Clin Invest.* 2001 Oct; 108(8):1167-74.); el hepatocito nuclear factor-4alfa (Leclerc *et al.* Hepatocito nuclear factor-4alfa envuelto en el tipo 1 de ataque-a madurez de la diabetes del joven es un nuevo blanco de la proteinocinasa activada-AMP. *La diabetes.* 2001 Jul; 50 (7):1515-21); C/EBPalfa y PPAR-gamma (Habinowski *et al.* Los efectos de AICAR en la diferenciación del adipocito de células 3T3-L1. *Biochem el Biophys Res Commun.* 2001 Sep 7; 286(5):852-6). De acuerdo con ellos, tales genes (o genes recombinantes que incorporan secuencias reguladoras desde estos genes) pueden usarse como genes del reportero.

Para la modulación de la actividad de proteinocinasa se incluye la inhibición o un aumento en la actividad de la proteinocinasa.

Se apreciará que en los métodos de la invención en donde la fosforilación de un polipéptido puede ocurrir que la presencia de un donador de fosfato conveniente puede requerirse, como fue descrito por el aspecto anterior de la invención. Los donadores de fosfato convenientes se conocerán por aquellos expertos en la técnica e incluyen el ATP, por ejemplo como la sal del magnesio (MgATP), como se describió en los Ejemplos.

El LKB1 es una preparación con STRAD y MO25. Como se señaló anteriormente, se considera que LKB1 está presente en un complejo con estos polipéptidos en las células y la presencia de estos polipéptidos se considera que refuerza la actividad del LKB1. El LKB1 (y preferentemente también el STRAD) puede, por ejemplo, ser purificado desde las células en las cuales el LKB1 (y preferentemente también el STRAD) se expresa naturalmente, pero puede ser más conveniente para por lo menos uno del LKB1, STRAD ser el recombinante. El MO25 es el recombinante y se expresa desde un recombinante del ácido nucleico.

El término AMPK se conocerá bien por los expertos en la técnica, como se indicó anteriormente. El AMPK (u otro sustrato, por ejemplo la proteína básica de mielina) usado en el experimento puede ser recombinante o no-recombinante. El AMPK puede ser un bacterianamente-expresado AMPK 1 de dominio catalizador (por ejemplo como se describió en [44]) o un complejo heterotrimérico como aquéllos descritos en [45] y en el Ejemplo 2. El AMPK puede tener la secuencia del aminoácido de un AMPK que ocurre naturalmente, o puede ser o puede comprender un polipéptido de fusión (por ejemplo según lo descrito en [45] o el Ejemplo 2), o puede ser un fragmento o variante de AMPK que ocurre naturalmente que retiene la habilidad de ser fosforilado o activado por el LKB1, por ejemplo según lo descrito en el Ejemplo 2. Así, se prefiere que el AMPK sea un AMPK que retiene un residuo de treonina (o serina) en la posición equivalente a la Treonina172 de longitud completa tipo-natural de dominio catalizador humano $\alpha 1$. Se prefiere que el AMPK no sea un mutante en el cual Tr172 es reemplazado por un residuo diferente al de serina, por ejemplo se reemplaza por el alanina. Un fragmento derivable del AMPK (o de un miembro de la subfamilia de AMPK) el cual comprende el residuo de Tr172 y por lo menos parte de la secuencia del bucle-T que incluye este residuo, por ejemplo por lo menos los 2, 3, 4, 5, 6 o 7 residuos de terminal-C y terminal-N de este residuo, es un sustrato conveniente para el uso en el método de exploración selectiva. Un ejemplo de tal sustrato del péptido se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplos de números de Asentimiento G1 para el dominio catalizador de la subunidad alfa 1 del AMPK humano incluye:

>gi5453964|ref|NP_006242.1|EnlaceLocus info proteinocinasa, subunidad catalizadora alfa 1, activada-AMP; alfa 1 del AMPK; proteinocinasa, activada-AMP, catalizador, alfa-1 [*Homo sapiens*]

gi20178277|spl|Q13131|AAK1_HUMANO 5'-proteinocinasa activada-AMP, cadena catalítica alfa-1 (cadena alfa-1 AMPK)

gi4115829|dbj|BAA36547.1|EnlaceLocus info de proteinocinasa activada-AMP alfa-1 [*Homo sapiens*]

Ejemplos de números de Asentimiento G1 para el dominio catalizador de la subunidad alfa 2 del AMPK humano incluye:

>gi11493357|embl|CAC17574.1|dJ758N20.1 (proteinocinasa, activada-AMP, subunidad catalítica alfa 2) [*Homo sapiens*]

>gi5453966|ref|NP_006243.1|EnlaceLocus info proteinocinasa, activada-AMP, subunidad catalítica alfa 2; proteinocinasa, activada-AMP [*Homo sapiens*]

De forma similar, el término LKB 1 se conocerá bien por los expertos en la técnica. El LKB1 usado en el ensayo puede ser recombinante o no-recombinante. El LKB 1 puede expresarse bacterianamente, pero se prefiere que se exprese en un sistema mamífero y/o expresado junto a STRAD y/o MO25, preferentemente ambos, por ejemplo como

se describió en los Ejemplos 1 y 2. El LKB 1 puede tener la secuencia del aminoácido de una ocurrencia natural del LKB1, o puede ser un polipéptido de fusión (por ejemplo como se describió en los Ejemplos), o puede ser un fragmento o variante de una ocurrencia natural del LKB 1 que retiene la habilidad a fosforilar o activar el AMPK, por ejemplo en Tr172 del AMPK, por ejemplo como describió en el Ejemplo 2. Así, el LKB1 es un LKB1 que retiene un dominio del cinasa activo. Un fragmento de LKB 1 que contiene el dominio del cinasa intacto pero no otras regiones del LKB1, puede ser útil; esta región de LKB 1 es suficiente para retener la actividad de la proteinocinasa y para actuar recíprocamente con STRAD. El LKB1 usado en el análisis que no es un mutante de cinasa inerte como se describe en los Ejemplos. Se prefiere que el LKB1 retenga la habilidad de actuar recíprocamente con STRAD y/o M025, como se discutió más adelante debajo.

Los números de Asentimiento para LKB 1 incluyen lo siguiente:

La proteína del síndrome de Peutz-Jeghers AAC15742 [*Homosapiens*] il3063585|gblAAC15742.1|[3063585]

La proteinocinasa 11 de Serina/Treonina 15831 (proteinocinasa-Serina/Treonina del LKB1) gil3024670|splQ15831|STKB HUMANO [3024670]

La proteinocinasa 11 de Serina/Treonina NP_000446 [*Homosapiens*] gil4507271|reflNP_000446.1|[4507271]

Se prefiere particularmente, aunque no es esencial, que el polipéptido de LKB1 tenga por lo menos 30% de la actividad enzimática del LKB1 humano de longitud-completa con respecto a la fosforilación del AMPK 1 humano de longitud-completa en el residuo Tr172 (preferentemente en la presencia de STRAD y M025) o un sustrato del péptido que abarca esta región, o fosforilación de la proteína básica de mielina. Se prefiere más si el polipéptido de LKB1 tiene por lo menos 50%, preferentemente por lo menos 70% y más preferentemente por lo menos 90% de la actividad enzimática del LKB1 humano de longitud-completa con respecto a la fosforilación del AMPK α 1 humano de longitud-completa en el residuo Tr172 (preferentemente en presencia de STRAD y M025) o un sustrato del péptido abarcando esta región.

De forma similar, los términos STRAD o M025 se conocerán bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido de STRAD (STRAD α) se describe en Baas *et al* (2003) EMBO J 22(12), 3062-3072 y en EMBL/GenBank Asentimiento número AF308302. Las secuencias humanas STRAD α y STRAD β (NCBI asentimiento número AAM1914) se muestran en la Figura 10. Los polipéptidos de M025 se describen en Miyamoto *et al* (1993); Karos y Fisher (1999) y Nozakide *et al* (1996) y, por ejemplo, en el Asentimiento No NP_057373 (M025 humano) y Q9H9S4 (M025 humano). Ejemplos adicionales de polipéptidos de M025 se muestran en la Figura 2 y los Nos del Asentimiento adicional se dan en la leyenda de la figura. M025 no lleva la homología de la secuencia a otras proteínas en la base de datos pero los recientes estudios indican que se relaciona estructuralmente al dominio de replicación del Armadillo (Milburn *et al.*, 2003). El STRAD usado en el ensayo puede ser recombinante o no-recombinante pero el M025 usado en el ensayo es el recombinante. El STRAD o M025 pueden expresarse bacterianamente, pero se prefiere que ellos estén expresados en un sistema de mamífero y/o expresados a lo largo de LKB1, por ejemplo como se describió en los Ejemplos 1 y 2. El STRAD o M025 puede tener la secuencia del aminoácido de una ocurrencia natural del STRAD o M025, o puede ser un polipéptido de fusión (por ejemplo como se describió en los Ejemplos), o puede ser un fragmento o variante de una ocurrencia natural del STRAD o M025 que retiene la habilidad para el STRAD de ligar al M025 y a LKB1, y para el M025 de ligar al STRAD o al complejo de LKB1 y STRAD. Por lo menos puede requerirse la región de terminal-C de M025. En vista de la conservación de la secuencia a lo largo de la longitud de M025 se considera que puede ser deseable usar la longitud completa de M025. Se prefiere que el polipéptido de STRAD tenga el terminal-C de la secuencia Trp-Asp/Glu-Phe (la cual se considera que reconoce M025) pero no se considera que esto es esencial, porque M025 puede ligar a STRAD faltando estos residuos cuando el STRAD está ligado a LKB 1 (vea Ejemplo 1). También se prefiere que el dominio del pseudocinasa de STRAD esté presente, ya que esto puede requerirse para el enlace de M025. Por ejemplo, se prefiere que el STRAD no sea un fragmento carente de los residuos que corresponden a los aminoácidos 88 de terminal-C del STRAD α de longitud completa (que tiene un dominio de pseudocinasa truncado y no interactúa con LKB 1 humano o M025 α). Puede ser deseable usar el STRAD de longitud completa.

La capacidad de, por ejemplo, el dicho polipéptido con respecto a actuar recíprocamente con o ligar a, por ejemplo, un polipéptido de STRAD, puede medirse por cualquier método de detección/medición de una interacción proteína/proteína, como se discutió más adelante debajo. Los métodos convenientes incluyen las interacciones de dos-híbridos de la levadura, copurificación, ELISA, coimmunoprecipitación, estudios de enlace-cruzado, estudios estructurales, métodos de transferencia de energía por resonancia y fluorescencia (FRET) y los métodos de resonancia de superficie de plasmón. Así, el dicho M025 (por ejemplo M025 α humano) puede ser considerado capaz de ligar a o interactuar con un polipéptido de STRAD (por ejemplo STRAD α humano) si una interacción puede detectarse entre el polipéptido de dicho M025 y el polipéptido de dicho STRAD por ELISA, coimmunoprecipitación o métodos de resonancia de superficie de plasmón o por una interacción de dos-híbridos de la levadura o método de copurificación, por ejemplo como se describió en el Ejemplo 1 o Ejemplo 2.

Se prefiere que la interacción pueda detectarse usando un método de resonancia de superficie de plasmón, como el descrito por ejemplo en el documento WO 00/56864. Puede inmovilizarse un polipéptido en la superficie de prueba,

ES 2 308 198 T3

por ejemplo éste puede ser acoplado a través de los grupos amino a un Sensor Chip CM5™, según las instrucciones del fabricante, o un polipéptido biotinilado puede ligarse a un avidina recubierto por el Sensor Chip SA. El otro polipéptido (a concentraciones entre, por ejemplo 0 y entre 10 μ M y 1.0 μ M, por ejemplo 2 μ M) se inyecta entonces encima de la superficie y se determina el enlace del estado estacionario en cada caso. De estas mediciones puede determinarse un Kd. Se prefiere que la interacción tenga un Kd de menos de 8 μ M, más preferentemente menos de 5 μ M, 2 μ M, 1 μ M, 500 nM, 300 nM, 200 nM o 100 nM, por ejemplo aproximadamente 150 nM,. Alternativamente, puede determinarse un Kd para un polipéptido en competición con el polipéptido inmovilizado. Un polipéptido (para el ejemplo a una concentración de 0.5 μ M) se mezcla con el polipéptido libre (por ejemplo, a concentraciones entre 0 y 3 μ M) y la mezcla se inyecta encima del polipéptido inmovilizado. El enlace del estado estacionario se determina en cada caso, desde el cual puede determinarse el Kd de la interacción usando la relación de Cheng-PreScott. Alternativamente, la interacción puede expresarse en términos de una respuesta observada o relativa a respuestas observadas, medida en términos de masa de proteína ligada a la superficie.

Mediante “variantes” de un polipéptido nosotros incluimos inserciones, deleciones y sustituciones, conservadora o no conservadora. En particular nosotros incluimos variantes del polipéptido donde tales cambios no alteran sustancialmente la actividad de la proteinocinasa o la habilidad de ligar a las parejas de enlace particulares, según lo apropiado.

Por medio de “sustituciones conservadoras” se intentan combinaciones como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

Se usa aquí el código de aminoácido de tres letras o una letra de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB, con la excepción del símbolo Zaa, definido anteriormente. En particular, Xaa representa cualquier aminoácido. Se prefiere que al menos los aminoácidos que corresponden a las secuencias del acuerdo general definidos aquí sean amino ácidos-L.

Se prefiere particularmente si la variante del polipéptido tiene una secuencia del aminoácido que tenga por lo menos 65% de actividad de identidad del LKB1 humano de longitud-completa con respecto a la fosforilación del AMPK 1 humano de longitud-completa en el residuo Tr172 (preferentemente en la presencia de STRAD y MO25) o un sustrato del péptido que abarca esta región, o fosforilación de la proteína básica de mielina. Se prefiere más si el polipéptido de LKB1 tiene por lo menos 50%, preferentemente por lo menos 70% y más preferentemente por lo menos 90% de la actividad enzimática del LKB1 humano de longitud-completa con respecto a la fosforilación del AMPK α 1 humano de longitud-completa en el residuo Tr172 (preferentemente en la presencia de STRAD y MO25) o un sustrato del péptido que abarca esta región. Con la secuencia del aminoácido del polipéptido humano aplicable, más preferentemente por lo menos 70%, 71%, 72%, 73% o 74%, todavía más preferentemente por lo menos 75%, aun todavía más preferentemente por lo menos 80%, en preferencia adicional por lo menos 85%, todavía más de la preferencia por lo menos 90% y lo más preferentemente por lo menos 95% o 97% de identidad con la secuencia del aminoácido del polipéptido humano aplicable.

Todavía se prefiere más si una variante de proteinocinasa tiene una secuencia del aminoácido que tenga por lo menos 65% de identidad con la secuencia del aminoácido del dominio catalizador del polipéptido humano, más preferiblemente por lo menos 70%, 71%, 72%, 73% o 74%, todavía más preferentemente por lo menos 75%, todavía aun más preferentemente por lo menos 80%, en la preferencia adicional por lo menos 83 u 85%, en preferencia adicional por lo menos 90% y el más preferentemente por lo menos 95% o 97% de identidad con la secuencia humana aplicable del aminoácido.

Se apreciará que el dominio catalizador de un polipéptido relacionado a la proteinocinasa puede identificarse rápidamente por una persona experimentada en la técnica, usando las comparaciones de la secuencia como se describió debajo. Las proteinocinasas muestran un centro catalizador conservado, según revisado en Johnson *et al* (1996) Célula, 85, 149-158 y Taylor y Radzio-Andzelm (1994) Estructura 2, 345-355. Este centro se pliega dentro de un lóbulo pequeño de Terminal-N que ampliamente comprende una lámina- β anti-paralela, y un gran lóbulo de terminal-C que es principalmente helicoidal- α .

El por ciento de la identidad de la secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse usando los programas de computación adecuados, por ejemplo el programa GAP del Grupo de Informática de Genética de la Universidad de Wisconsin y se apreciará que el por ciento de identidad se calcula con respecto a los polipéptidos cuya secuencia se ha alineado óptimamente.

La alineación puede llevarse a cabo fuera alternativamente usando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Los parámetros usados pueden ser como sigue:

Los parámetros de alineación de rápido apareamiento: tamaño K-tuple (aviso); 1, tamaño de ventana; 5, penalidad del hueco; 3, el número de diagonales de la cima; 5. Método de anotación: por ciento de x.

Parámetros de alineación múltiples: penalidad de hueco abierto; 10, penalidad de extensión del hueco; 0.05.

Matriz de anotación: BLOSUM.

Se apreciará que las secuencias de MO25 mostradas en la Figura 2 son ejemplos de variantes de MO25 según lo definido anteriormente.

El residuo equivalente a, por ejemplo, Tr 172 del AMPK 1 humano de longitud-completa puede identificarse por la alineación de la secuencia del polipéptido con que el AMPK 1 humano de longitud-completa maximiza de tal forma el juego entre las secuencias. La alineación puede llevarse a cabo por inspección visual y/o por el uso de programas de computación apropiados, por ejemplo el programa GAP del Grupo de Informática de Genética de la Universidad de Wisconsin, que también permitirá calcular el por ciento de identidad de los polipéptidos. El programa Align (Pearson (1994) en: Métodos en Biología Molecular, Análisis Computarizados de los Datos de la Secuencia, Parte II (Griffin, AM y Griffin, Ediciones HG) Págs. 365-389, Human Press, Clifton). Así, los residuos identificados de esta manera también son “residuos equivalentes”.

Se apreciará que en el caso de formas truncadas de AMPK 1 o en las formas donde han ocurrido sustituciones simples de los aminoácidos es fácil identificar el “residuo equivalente”.

Se prefiere que los polipéptidos usados en la exploración selectiva sean mamíferos, preferentemente humanos (o unas especies útiles en la agricultura o como un animal doméstico o acompañante, por ejemplo el perro, el gato, el caballo, la vaca), incluyendo la ocurrencia natural de variantes alélicas (incluso las variantes del empalme). Los polipéptidos usados en la exploración selectiva pueden comprender una porción de GST o pueden ser biotinilados o de otra manera unidos, por ejemplo con un 6His, HA, myc u otro apéndice de epítipo, como se conoce por los expertos en la técnica, o según lo descrito en los Ejemplos 1 y 2. Esto puede ser útil en purificar y/o detectar el polipéptido(s). μ

El efecto del compuesto puede ser determinado comparando la proporción o grado de fosforilación del polipéptido del sustrato por el LKB1 en la presencia de concentraciones diferentes del compuesto, por ejemplo en la ausencia y en la presencia del compuesto, por ejemplo a una concentración de aproximadamente 100 μ M, 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M y/o 0.001 μ M.

El compuesto puede imitar el efecto de la interacción de STRAD y/o M025 con LKB1. Un compuesto que imita el efecto de STRAD y/o M025 en LKB 1 puede aumentar la proporción o magnitud de la fosforilación del polipéptido del sustrato (por ejemplo AMPK o un miembro de la subfamilia o un fragmento cualquiera de éste).

Por “imitar el efecto de la interacción de STRAD y/o M025 con LKB1” se significa que el compuesto tiene un efecto cuantitativo o cualitativo sobre el LKB1, por ejemplo en su actividad o estabilidad de la proteinocinasa, como se discutió en los Ejemplos 1 y 2. Por ejemplo, se considera que STRAD y M025 incrementan la velocidad a la cual los fosforilatos del LKB1, por ejemplo, AMPK o la proteína básica de la mielina; un imitador de STRAD o M025 puede aumentar la velocidad a la cual el LKB 1 (en la ausencia de STRAD y/o M025) fosforila un polipéptido del sustrato, por ejemplo el AMPK.

La subfamilia del AMPK se discute en el Ejemplo 2 (y también vea [41]) e incluye los siguientes polipéptidos:

MELK (Heyer *et al.*, 1999 Expresión de Melk, una nueva proteinocinasa, durante el desarrollo temprano del ratón. Dev Dyn, 215, 344-351; Heyer *et al.*, 1997 Nuevo miembro de la familia del cinasa Snf1/AMPK, Melk, se expresa en el huevo del ratón y embrión de la preimplantación. (Mol Reprod Dev, 47, 148-156.)

QIK (Xia *et al.*, 2000 El nuevo cinasa del serina-treonina, Qik, es un objetivo del oncogén de Qin. Biochem Biophys Res Commun, 276, 564-570)

SIK (Coyle *et al.*, 2003 Sam68 refuerza la utilización citoplasmática de ARN conteniendo-intrón y se regula funcionalmente por el cinasa nuclear Sik/BRK. Mol Cell Biol, 23, 92-103; Derry *et al.*, 2003 Localización Alterada y actividad del cinasa de tirosina intracelular BRK/Sik en las células del tumor de próstata. Oncogén, 22, 4212-4220; Derry *et al.*, 2000 Sik (BRK) fosforilatos Sam68 en el núcleo y negativamente regula su habilidad de enlace al ARN. Mol Cell Biol, 20, 6114-6126; Feldman *et al.*, 2000 el cinasa sal-inducible, SIK, es inducido por la despolarización en el cerebro. J Neurochem, 74, 2227-2238; Horike *et al.*, 2002 Papeles de varios dominios identificados en la estructura primaria de cinasa sal-inducible (SIK). Endocr Res, 28, 291-294.; Lin *et al.*, 2000 SIK (cinasa sal-inducible): regulación de la expresión del gen esteroideogénico ACTH-mediado y redistribución nuclear/cito sol. Endocr Res, 26, 995-1002.; Llor *et al.*, 1999 Expresión de BRK/Sika en el tracto gastrointestinal y en los tumores del colon. Clin Cancer Res, 5, 1767-1777.; Vasioukhin y Tyner, 1997 Un papel para el cinasa de tirosina de célula-epitelial-específica Sik durante la diferenciación del queratinocito. Proc Natl Acad Sci. Estados Unidos, 94, 14477-14482; Wang *et al.*, 1999 Clonación de un nuevo cinasa (SIK) de la familia de SNF1/AMPK desde la rata suprarrenal dieta alta de sal-tratada. FEBS Lett, 453, 135-139).

Otros miembros de la familia incluyen NuaK1, NuaK2, BrsK1, BrsK2 y QSK, sobre los cuales se conoce poco. Nosotros consideramos que el LKB1 puede fosforilar y activar estas otras proteinocinasas en la subfamilia del AMPK. Otros miembros de la familia (los cuales están en una rama del árbol de la cinasa inmediatamente adyacente a los miembros de la familia indicados anteriormente) incluyen MARK1, MARK2, MARK3 y MARK4. Por ejemplo, vea Manning *et al* (2002) La proteinocinasa complemento del genoma humano. Ciencia 298, 1912-1934. MARK3 también es conocido como PARI A o C-TAK1 (Peng *et al.* (1998) Crecimiento Celular Diferente 9, 197-208; Spicer *et al* (2003) Oncogén 22, 4752-4756.

La metformina o sus análogos pueden estar actuando a través de la activación de uno de estas cinasas así como a través del AMPK. Tal miembro de la subfamilia o fragmento de éste o fusión de tal fragmento (por ejemplo un péptido de bucle-T, según lo discutido anteriormente y en el Ejemplo 3) puede ser un sustrato conveniente para el uso en el método de exploración selectiva del primer aspecto de la invención.

Un compuesto identificado por un método de la invención puede modular la habilidad del proteinocinasa para fosforilar diferentes sustratos, por ejemplo diferentes miembros de la subfamilia del AMPK que ocurren de forma natural, a diferentes magnitudes. Así, se prefiere, pero no es esencial, que cuando el método de exploración selectiva para un compuesto para el uso en modular la actividad del AMPK, que el AMPK o un fragmento del mismo se use como el sustrato. De forma similar, se prefiere, pero no es esencial, que cuando el método de exploración selectiva para un compuesto para el uso en modular la actividad de un miembro particular de la subfamilia del AMPK, que ese miembro de la subfamilia o un fragmento de éste se use como el sustrato.

El método es útil en identificar los compuestos que, por ejemplo, promueven la activación del AMPK o de un miembro de la subfamilia. Un compuesto que desencadena la activación del AMPK o de un miembro de la subfamilia del AMPK puede ser útil en el tratamiento de la diabetes y la obesidad. Tal compuesto puede imitar la actividad de la metformina o sus análogos y puede ser de mayor potencia.

LKB 1 también es una proteinocinasa supresora del tumor que inhibe el crecimiento celular y la proliferación. Los resultados presentados aquí indican que las funciones de supresor del tumor del LKB1 pueden mediar a través de la fosforilación del LKB1 y desencadenar la activación del AMPK y/o uno o más miembros de la subfamilia indicado anteriormente. Así, estos polipéptidos pueden ser nuevas proteinocinasas supresoras del tumor y un compuesto que active una o más de estas proteinocinasas puede ser útil para tratar el cáncer.

Un compuesto que promueve la fosforilación o activación del AMPK o de un miembro de la familia del AMPK puede actuar mediante la estabilización del complejo de LKB1-STRAD-MO25. Puede ser útil tamizar para tal efecto de estabilización (o antes o después o en cambio la selección en base a un ensayo de la actividad de la proteinocinasa según lo descrito anteriormente). Por ejemplo, tal selección podría involucrar evaluar los efectos de un compuesto sobre la formación o estabilidad del complejo, por ejemplo usando los métodos para evaluar las interacciones moleculares, según lo discutido anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse métodos de coinmunoprecipitación o copurificación, o un sistema informador de dos híbridos gen/levadura. Un complejo también puede detectarse usando las técnicas de transferencia de energía de resonancia fluorescencia (FRET) (por ejemplo usando proteínas de fusión que comprenden las proteínas fluorescentes por ejemplo, por ejemplo las proteínas fluorescentes, por ejemplo las proteínas fluorescentes verdes, azules o amarillas (GFPs; YFPs, BFPs, bien conocidas por los expertos en la técnica)), por ejemplo en el material de células en las cuales el LKB1 y el STRAD y/o MO25 son coexpresados, según lo descrito en los Ejemplos 1 y 2.

El compuesto puede ser uno que entrelaza o acerca una región de contacto entre dos o más de LKB1, STRAD, y MO25, o quizá uno que entrelaza a otra región y, por ejemplo, induce un cambio conformacional o alostérico que estabiliza (o desestabiliza) el complejo; o promueve (o inhibe) su formación. El compuesto puede ligar a LKB 1 o STRAD o MO25 (o al complejo como un todo) para así incrementar la actividad de la proteinocinasa del LKB1 por un efecto alostérico. Este efecto alostérico puede ser un efecto alostérico que está envuelto en la regulación natural de la actividad del LKB1.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para hacer una preparación que comprende LKB1, STRAD y el MO25 recombinante. La preparación puede comprender el LKB1 recombinante y/o STRAD recombinante. La preparación puede ser útil en un ensayo del primer aspecto de la invención.

Por “purificado” se significa que la preparación se ha separado por lo menos parcialmente de otros componentes en presencia de la cual se ha formado H, por ejemplo otros componentes de una célula del recombinante. Ejemplos de métodos de purificación que pueden usarse se describen en los Ejemplos.

La preparación puede ser substancialmente pura. Por “substancialmente pura” nosotros queremos decir que dicho polipéptido(s) está substancialmente libre de otras proteínas. Así, nosotros incluimos cualquier composición que incluye por lo menos 30% del contenido de la proteína en peso como los dichos polipéptidos, preferentemente por lo menos 50%, más preferentemente por lo menos 70%, todavía más preferentemente por lo menos 90% y el más preferentemente por lo menos 95% del contenido de la proteína son los dichos polipéptidos.

Así, la invención también incluye composiciones que comprenden los dichos polipéptidos y un contaminante en donde el contaminante comprende menos del 70% de la composición por peso, preferentemente menos del 50% de la composición, más preferentemente menos del 30% de la composición, todavía más preferentemente menos del 10% de la composición y la mayoría preferentemente menos de 5% de la composición por peso.

La invención también incluye los dichos polipéptidos substancialmente puros cuando combinados con otros componentes *en vivo*, dichos otros componentes que no son todos los componentes encontrados en la célula en los cuales se encuentran dichos polipéptidos.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una célula capaz de expresar LKB1, STRAD y sobre expresados o el M025 recombinante. La célula puede comprender un ácido nucleico recombinante que codifica M025, y/o un ácido nucleico recombinante que codifica LKB1, y/o un ácido nucleico recombinante que codifica STRAD. La célula puede ser capaz de sobre expresar M025 desde la secuencia endógena que pone en código M025, usando por ejemplo las técnicas de secuencia-desencadenamiento específico de activadores de la transcripción. La célula puede ser una célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo puede ser una célula eucariótica, por ejemplo un insecto, levadura o célula de mamífero, por ejemplo una célula humana. Se describen ejemplos de células convenientes, por ejemplo, en los Ejemplos.

El ácido nucleico recombinante es preferentemente conveniente para expresar el polipéptido puesto en código. El ácido nucleico recombinante puede estar en la forma de un vector de expresión. Los polinucleótidos recombinantes convenientes para expresar un polipéptido dado se conocen bien por los expertos en la técnica, y los ejemplos se describen en los Ejemplos 1 y 2.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una célula que comprende LKB1, STRAD y sobre expresado o M025 recombinante. La célula puede comprender el LKB1 recombinante y/o STRAD recombinante. La célula puede ser una célula según el aspecto precedente de la invención. La célula puede comprender por lo menos 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 5, 10 o 20-veces más M025 (o LKB1, o STRAD, según sea apropiado) que una célula equivalente que no se ha modificado para sobre expresar M025 o para expresar el M025 recombinante.

Por "conveniente para expresar" se significa que el polinucleótido es un poli nucleótido que puede traducirse para formar el polipéptido, por ejemplo ARN, o que el polinucleótido (que es preferentemente ADN) poniendo en código el polipéptido de la invención se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, en orientación apropiada y el marco de lectura correcto para la expresión. El polinucleótido puede unirse a las secuencias transcripcional y traduccional del nucleótido de control regulador apropiado reconocidas por cualquier huésped deseado; tales controles pueden incorporarse en el vector de expresión.

Las características de vectores convenientes para la replicación en las células eucarióticas de mamífero se conocen bien por los expertos en la técnica, y los ejemplos se dan debajo. Se apreciará que un vector puede ser conveniente para la replicación en ambas células tanto procarióticas como eucarióticas.

Se han desarrollado una variedad de métodos para operativamente vincular los polinucleótidos, especialmente el ADN, a los vectores por ejemplo por la vía del término cohesivo complementario. Se describen los métodos convenientes en Sambrook *et al* (1989) Clonación Molecular, Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, Nueva York.

Una forma deseable para modificar el ADN que pone en código un polipéptido de la invención es usar la reacción en cadena del polimerasa como se describe por Saiki *et al* (1988) Ciencia 239, 487-491. Este método puede usarse para introducir el ADN en un vector conveniente, por ejemplo diseñando en los sitios de restricción convenientes, o puede usarse para modificar el ADN en otras maneras útiles según lo conocido en la técnica.

En este método el ADN a ser amplificado enzimáticamente se flanquea por dos plantillas específicas que ellos mismos incorporan en el ADN amplificado. Las plantillas específicas pueden contener sitios de reconocimiento de restricción de endonucleasa que pueden usarse para clonar en vectores de expresión que usan métodos conocidos en la técnica.

El ADN (o en el caso de vectores retrovirales, ARN) se expresa entonces en un huésped conveniente para producir un polipéptido que comprende el compuesto de la invención. Así, el ADN que pone en código el polipéptido que constituye el compuesto de la invención puede usarse de acuerdo con las técnicas conocidas, apropiadamente modificadas en vista de las enseñanzas contenidas aquí, para construir un vector de expresión que se usa entonces para transformar una célula del huésped apropiada para la expresión y producción del polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen aquellas descritas en las Patentes americanas Nos. 4.440.859 publicada el 3 de abril de 1984 por Rutter *et al*, 4.530.901 publicada el 23 de julio de 1985 por Weissman, 4.582.800 publicada el 15 de abril de 1986 por Crowl, 4.677.063 publicada el 30 de junio de 1987 por Mark *et al*, 4.678.751 publicada el 7 de julio de 1987 por Goeddel, 4.704.362 publicada el 3 noviembre de 1987 por Itakura *et al*, 4.710.463 publicada el 1 de diciembre de 1987 por Murray, 4.757.006 publicada el 12 de julio de 1988 por Toole, Jr *et al*, 4.766.075 publicada el 23 de agosto de 1988 por Goeddel *et al* y 4.810.648 publicada el 7 de marzo de 1989 por Stalker, todas incorporadas aquí por referencia.

El ADN (o en el caso de vectores retrovirales, ARN) poniendo en código el polipéptido puede unirse a una amplia variedad de otras secuencias de ADN para la introducción en un huésped apropiado. El ADN de compañía dependerá de la naturaleza del huésped, la manera de la introducción del ADN en el huésped, y si se desea mantenimiento o integración episomático.

Generalmente, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, en orientación apropiada y el marco de lectura correcto para la expresión. Si es necesario, el ADN puede unirse a las secuencias transcripcional y traduccional del nucleótido de control regulador apropiado reconocidas por cualquier huésped deseado, aunque tales controles están generalmente disponibles en el vector de expresión. El vector se introduce entonces en el huésped a través de las técnicas normalizadas. Generalmente, no todos los huéspedes se transformarán por el vector. Por

consiguiente, será necesario seleccionar por las células del huésped transformadas. Una técnica de selección involucra incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN, con cualquiera de los elementos de control necesario, que codifica para un rasgo seleccionable en la célula transformada, como la resistencia a antibióticos. Alternativamente, el gen para tal rasgo seleccionable puede estar en otro vector el cual se usa para cotransformar la célula del huésped deseada.

Las células del huésped que se han transformado por el ADN recombinante de la invención se cultivan entonces por un tiempo suficiente y bajo condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la técnica en vista de las enseñanzas descritas aquí para permitir la expresión del polipéptido, la cual puede entonces recuperarse.

Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo las bacterias (por ejemplo el *E. coli* y el *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo el *Saccharomyces cerevisiae*), los hongos filamentosos (por ejemplo el *Aspergillus*), células de la planta, células de animales y células de insecto.

Los vectores incluyen un replicón del procariota, como el ColE1 ori, para la propagación en un procariota, aun cuando el vector será usado para la expresión en otros tipos celulares, no-procariotas. Los vectores también pueden incluir un promotor apropiado como un promotor del procariota capaz de dirigir la expresión (transcripción y traducción) de los genes en una célula del huésped bacteriana, como el *E. coli*, transformada con éste.

Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite el enlace de polimerasa ARN y que ocurra la transcripción. Las secuencias del promotor compatible con los huéspedes bacterianos ejemplares se proporcionan típicamente en los vectores del plásmido que contienen los sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN de la presente invención.

Los plásmidos de vector procariota típicos son pUC18, pUC19, pBR322 y pBR329 disponibles de los Laboratorios de Biorad, (Richmond, CA, EE.UU.) y pTrec99A y pKK223-3 disponibles de Farmacia, Piscataway, NJ, EE.UU.

Un plásmido de vector de célula de mamífero típico es el pSVL disponible de Farmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Este vector usa el promotor atrasado SV40 para manejar expresión de genes clonados, el nivel más alto de expresión que se encuentra en las células que producen antígeno T, como las células COS-1.

Un ejemplo de un vector inducible de la expresión del mamífero es el pMSG, también disponible de Farmacia. Este vector usa el promotor glucocorticoide-inducible del virus del tumor mamario del ratón, el término largo se repite para manejar la expresión del gen clonado.

Los vectores útiles del plásmido de levadura son pRS403-406 y pRS413-416 y están generalmente disponibles desde de Sistemas de Clonación de Stratagene, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son Plásmidos que integran la levadura (YIps) e incorporan los marcadores seleccionables de la levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son los plásmidos de Levadura de Centromere (YCps).

La célula del huésped puede ser procariota o eucariota. Se prefieren las células bacterianas que son células procariota del huésped y típicamente es una cepa de *E. coli* como, por ejemplo, las cepas DH5 de *E. coli* disponibles de los Laboratorios de Investigación de Bethesda Inc., Bethesda, MD, EE.UU., y RR1 disponible de la Colección de Cultura de Tipo Americana (ATCC) de Rockville, MD, EE.UU., (No ATCC 31343). Las células eucariotas del huésped preferido incluyen las células de la levadura, insecto y mamífero, preferentemente las células vertebradas, como aquéllas de un ratón, rata, mono o línea celular fibroblástica humana. Las células del huésped de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501 que están generalmente disponibles de Sistemas de Clonación de Stratagene, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células del huésped del mamífero preferido incluyen células 293 del riñón embrionario humano (vea Ejemplo 1), las células del ovario de la marmota china (CHO) disponibles del ATCC como CCL61, las células de embrión de ratón suizo NIH/3T3 disponibles del ATCC como CRL 1658, y las células del riñón mono -derivadas de COS-1, disponibles del ATCC como CRL 1650. Las células de insecto preferidas son células de Sf9 que pueden ser transfectadas con los vectores de expresión del baculovirus.

La transformación de los huéspedes apropiados de la célula con una estructura de ADN se cumple por los métodos bien conocidos que típicamente dependen del tipo de vector usado. Con respecto a la transformación de las células procariotas del huésped, vea, por ejemplo, Cohen *et al* (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 69, 2110 y Sambrook *et al* (1989) Clonación Molecular, Un Manual de Laboratorio, Laboratorio de Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY. La transformación de células de levadura se describe en Sherman *et al* (1986). También son útiles Métodos en las Genéticas de Levadura, Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor, NY., El método de Beggs (1978), Naturaleza 275, 104-109. Con respecto a las células vertebradas, reactivos útiles en la transfección de tales células, por ejemplo, el fosfato del calcio y DEAE-dextrano o formulaciones del liposoma, están disponibles de Sistemas de Clonación de Stratagene, o Tecnologías de Vida Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE.UU..

La electroporación también es útil para transformar y/o transfectar células y es bien conocida en la técnica para transformar células de la levadura, células bacterianas, células de insecto y células de vertebrado.

Por ejemplo, muchas especies bacterianas pueden ser transformadas por los métodos descritos en Luchansky *et al* (1988) Mol. Microbiol. 2, 637-646 incorporadas aquí para referencia. El número mayor de transformantes se recupera

ES 2 308 198 T3

de forma consistente siguiendo la electroporación de la mezcla ADN-célula suspendida en 2.5X PEB que usa 6250V por cm. a 25:FD.

Se describen métodos para la transformación de levadura por electroporación en Becker y Guarente (1990) Métodos Enzimol. 194, 182.

Pueden identificarse células transformadas con éxito por las técnicas bien conocidas, por ejemplo células que contienen una estructura de ADN de la presente invención. Por ejemplo, células que son el resultado de la introducción de una estructura de la expresión de la presente invención pueden crecerse para producir el polipéptido de la invención. Las células pueden cosecharse y ser lisadas y su contenido de ADN ser examinado para la presencia del ADN usando un método como el descrito por Southern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503 o Berent *et al* (1985) Biotech. 3, 208.

Además de ensayar directamente para la presencia de ADN recombinante, la transformación exitosa puede confirmarse por los métodos inmunológicos bien conocidos cuando el ADN recombinante es capaz de dirigir la expresión de la proteína. Por ejemplo, las células transformadas con éxito con un vector de la expresión producen proteínas que despliegan la antigenicidad apropiada. Las muestras de células sospechosas de transformarse se recolectan y se ensayan para la proteína utilizando los anticuerpos convenientes.

Así, además de las células del huésped transformadas a sí mismas, la presente invención también contempla un cultivo de esas células, preferentemente un cultivo monoclonal (clonablemente homogéneo), o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutriente.

Un aspecto adicional del método de la invención para hacer una preparación de la invención, que comprende el paso de purificar la preparación de una célula según la invención. Los métodos de cultivar células del huésped y aislar las proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. Se describen ejemplos de técnicas de purificación convenientes en los Ejemplos. Por ejemplo, uno o más componentes de la preparación pueden marcarse para ayudar a la purificación usando los reactivos de afinidad, como se conocerá bien por los expertos en la técnica y según lo descrito en los Ejemplos. También pueden utilizarse las técnicas cromatográficas, por ejemplo según lo descrito en los Ejemplos.

La preparación del aspecto precedente de la invención puede comprender, por ejemplo, LKB1, STRAD o MO25 etiquetados. Las proporciones de LKB1:STRAD:MO25 pueden ser 1:1:1, por ejemplo cuando se mide utilizando técnicas como las descritas en los Ejemplos. Se apreciará que la proporción determinada puede variar, en dependencia de los detalles del método usado en proporcionar la preparación. La preparación puede comprender un complejo que comprende LKB1, STRAD y MO25, como se describió en los Ejemplos.

El método del primer aspecto de la invención puede realizarse con LKB1 en la forma de una preparación hecha por el método del segundo aspecto de la invención; o una preparación o complejo obtenido o asequible por el método según lo indicado anteriormente; o en una célula de la invención.

Los polipéptidos anteriores pueden hacerse por métodos bien conocidos en la técnica y según lo descrito debajo y en el Ejemplo 1 ó 2, usando por ejemplo métodos de biología molecular o métodos automatizados de síntesis química del péptido.

Se apreciará que los compuestos péptidos miméticos también pueden ser útiles. Así, por "polipéptido" o "péptido" nosotros no sólo incluimos moléculas en las cuales los residuos del aminoácido están unidos por los vínculos del péptido (-CO-NH-) sino también por las moléculas en las cuales el enlace del péptido se invierte. Pueden hacerse tales péptidos miméticos del retro-inverso usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como aquéllos descritos en Mézière *et al* (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, incorporados aquí para referencia. Este abordaje involucra la fabricación de pseudopéptidos que contienen cambios que involucran la espina dorsal, y no la orientación de cadenas colaterales. Mézière *et al* (1997) muestra que, por lo menos para las respuestas celulares MHC clase II y auxiliador de T, estos pseudopéptidos son útiles. Los péptidos retro-inversos que contienen los enlaces NH-CO en lugar de los enlaces CO-NH del péptido, son mucho más resistentes a la proteólisis.

De forma similar, el enlace del péptido puede distribuirse del todo, con tal de que se use una mitad del ligador apropiado que retiene el espacio entre los átomos C α de los residuos del aminoácido; se prefiere particularmente si la mitad del ligador tiene substancialmente la misma distribución de carga y substancialmente la misma planaridad como un enlace del péptido.

Se apreciará que el péptido puede bloquearse convenientemente en su término C Nor para ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exoproteolítica.

Así, se apreciará que el polipéptido de STRAD o M025 puede ser un compuesto peptidomimético.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para identificar un compuesto para modular la actividad celular del LKB1, el método que comprende los pasos de (1) determinar si un compuesto de prueba modula (por ejemplo incrementa) la actividad de la proteinocinasa del LKB1 de una preparación o complejo o célula como se definió respecto a cualquier aspecto precedente de la invención y (2) seleccionar un compuesto que modula la actividad

de dicha proteinocinasa del LKB1. La actividad de la proteinocinasa del LKB1 puede medirse usando, por ejemplo, la proteína básica de la mielina como un sustrato, o usando AMPK o un miembro de la subfamilia del AMPK o un fragmento de éste (según lo discutido anteriormente y en el Ejemplo 3) como el sustrato. Un compuesto que modula, por ejemplo que incrementa la actividad de la proteinocinasa del LKB 1, puede ser útil en la medicina, por ejemplo para tratar el cáncer.

Los compuestos identificados en los métodos pueden por sí mismos ser útiles como un fármaco o pueden representar la primacía de los compuestos para el diseño y síntesis de compuestos más eficaces.

El compuesto puede ser un compuesto semejante a fármaco o lleva el compuesto para el desarrollo de un compuesto semejante a fármaco para cada uno de los métodos anteriores de identificar un compuesto. Se apreciará que los métodos pueden ser útiles como ensayos de exploración selectiva en el desarrollo de compuestos farmacéuticos o fármacos, bien conocidos por los expertos en la técnica.

El término “compuesto semejante a fármaco” se conoce bien por los expertos en la técnica, y puede incluir el significado de un compuesto que tiene características que pueden hacerlo conveniente para el uso en la medicina, por ejemplo como el ingrediente activo en un medicamento. Así, por ejemplo, un compuesto semejante a fármaco puede ser una molécula que puede sintetizarse por las técnicas de la química orgánica, menos preferentemente por las técnicas de biología molecular o bioquímica, y es preferentemente una molécula pequeña que puede ser de menos de 5000 daltones. Un compuesto semejante a fármaco puede exhibir adicionalmente los rasgos de interacción selectiva con una proteína particular o proteínas y estar biodisponible y/o capaz de penetrar las membranas celulares, pero se apreciará que estos rasgos no son esenciales.

De forma similar, el término “compuesto de primacía” se conoce bien por aquellos expertos en la técnica, y puede incluir el significado que el compuesto, aunque no conveniente por sí mismo para el uso como un fármaco (por ejemplo porque sólo es débilmente potente contra su objetivo intencional, no-selectivo en su acción, inestable, difícil de sintetizar o tiene pobre biodisponibilidad) puede proporcionar un punto de partida para el diseño de otros compuestos que pueden tener características más deseables.

Se entenderá que será deseable identificar compuestos que pueden modular la actividad de la proteinocinasa *in vivo*. Así se entenderá que los reactivos y condiciones usadas en el método pueden escogerse de forma tal que las interacciones, por ejemplo, entre el dicho LKB1 y, por ejemplo, los polipéptidos STRAD o MO25, sean substancialmente iguales que entre el LKB1 humano y STRAD humano y/o MO25. Se apreciará que el compuesto puede ligar al LKB1, o pueda ligar al STRAD o MO25.

Los compuestos que se prueban en los métodos de exploración selectiva del ensayo o en otros ensayos en los cuales puede medirse la habilidad de un compuesto para modular la actividad de la proteinocinasa de una proteinocinasa, por ejemplo LKB1, pueden ser compuestos que se han seleccionado y/o diseñado (incluyendo modificación) usando las técnicas del modelado molecular, por ejemplo utilizando las técnicas de computación. El compuesto seleccionado o diseñado puede sintetizarse (si no ya sintetizado) y probado para su efecto en el LKB1, por ejemplo su efecto en la actividad de la proteinocinasa. El compuesto puede probarse en un método de exploración selectiva de la invención.

Se apreciará que los ensayos de exploración selectiva, los cuales son capaces de un funcionamiento alto se preferirán particularmente. Los ejemplos pueden incluir los ensayos descritos basados en la célula y los ensayos del enlace proteína-proteína. Un ejemplo adicional es un sistema basado en SPA (Ensayo de Proximidad de Centelleo; Amersham International), también conocido por los expertos en la técnica. Otros métodos de detectar interacciones polipéptido/polipéptido incluyen la ultra filtración con métodos de espectroscopia de masa por rociado del ión/HPLC u otros métodos físicos y analíticos. Pueden usarse los métodos de Transferencia de Energía por Resonancia y Fluorescencia (FRET), por ejemplo, bien conocidos por los expertos en la técnica, en los cuales puede medirse el enlace de dos entidades fluorescentes designadas midiendo la interacción de los fluorescentes designados cuando están en proximidad íntima uno a otro.

Un aspecto adicional de la invención es un compuesto identificado o identificable por un método de exploración selectiva de la invención.

Aún un aspecto adicional de la invención es un compuesto de la invención para el uso en la medicina.

El compuesto puede administrarse de cualquier manera conveniente, normalmente parenteralmente, por ejemplo vía intravenosa, intraperitoneal, o intramuscular o intravesical, en el estándar estéril, formulaciones no pirogénicas de los diluentes y portadores. El compuesto también puede administrarse tópicamente. El compuesto también puede administrarse en una manera localizada, por ejemplo por inyección. El tratamiento puede consistir en una sola dosis o una pluralidad de dosis durante un período de tiempo. El compuesto puede ser útil como un agente anticancerígeno o para el tratamiento de, por ejemplo, la diabetes o la obesidad.

Aunque es posible para un compuesto de la invención ser administrado exclusivamente, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica, junto con uno o más portadores aceptables. El portador(s) debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con el compuesto de la invención y no deletéreo a los recipientes de éste. Típicamente, los portadores serán agua o solución salina que serán estériles y libres de pirógeno.

Así, la invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto identificado o identificable por los métodos de exploración selectiva de la invención y un portador aceptable farmacéuticamente.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un juego de partes que comprenden LKB 1 o un polinucleótido recombinante de LKB1 poniendo en código STRAD o un polinucleótido recombinante que pone en código STRAD, o poli nucleótido recombinante poniendo en código MO25. Un aspecto adicional de la invención proporciona un juego de partes que comprenden (1) AMPK o a un miembro de la subfamilia de AMPK, o polinucleótido recombinante que pone en código a AMPK o a un miembro de la subfamilia de AMPK (incluso un fragmento de éste según lo discutido anteriormente o en el Ejemplo 3) y (2) un juego de partes según lo definido respecto al aspecto precedente de la invención, o célula de la invención. Tales juegos pueden ser útiles en formar una preparación o complejo que pueden ser útiles en, por ejemplo un método de exploración selectiva del primer aspecto de la invención. El polinucleótido(s) recombinante puede estar en un vector de expresión (por ejemplo según lo discutido anteriormente) o (menos deseablemente) útil para la expresión *in vitro*.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de preparar un complejo de LKB1/STRAD/MO25 que comprende los pasos de (1) seleccionar un tipo de célula en la cual sobre expresa LKB1, comprendiendo el paso de determinar si el tipo de célula es uno que expresa STRAD y MO25, y preparar un complejo de LKB1/STRAD/MO25 por medio de la sobre expresión de LKB1 en el tipo celular seleccionado. Los métodos para determinar si el tipo celular expresa a STRAD y MO25 se conocerán bien por los expertos en la técnica, y se describen ejemplos de tales métodos en los Ejemplos. Alternativamente, el tipo de célula puede ser uno que ya se conoce para expresar STRAD α y MO25 α . Los ejemplos de tales células incluyen 293, HeLa, G361 y Rat2.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para preparar un complejo de LKB1/STRAD/MO25 que comprende los pasos de (1) sobre expresión de LKB1 en una célula usando un método según el aspecto precedente de la invención y (2) preparar dicho complejo desde la célula. Se describen métodos convenientes para preparar el complejo de LKB1/STRAD/MO25 en los Ejemplos.

La sobre expresión de LKB1 puede llevar a la detención del crecimiento, por ejemplo en las células del eucariota. Por consiguiente, puede ser necesario expresar LKB1 usando un sistema de expresión transitorio, por ejemplo según lo descrito en los Ejemplos, o usando un sistema de expresión regulado (inducible), también conocido por los expertos en la técnica.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método identificando una diferencia genética asociada con SPJ (Síndrome de Peutz-Jeghers) que comprende los pasos de (1) investigar la secuencia de un gen que pone en código un STRAD o una isoforma de MO25 en por lo menos un paciente que tiene SPJ (2) identificar cualquier diferencia entre la secuencia del paciente y la secuencia equivalente de un individuo sin SPJ. La asociación de LKB1 con STRAD y MO25 y la asociación de deficiencia de LKB1 con SPJ sugieren que los defectos en MO25 o STRAD también podrían estar involucrados en SPJ. Las técnicas para identificar mutaciones en los genes aspirantes, y para investigar si una mutación está ligada con la enfermedad o no, se conocerá bien por los expertos en la técnica.

Así, la invención proporciona STRAD o MO25 o un polinucleótido recombinante codificando los mismos para el uso en la medicina. Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de STRAD o MO25 o un poli nucleótido recombinante codificando los mismos en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer, el SPJ, la diabetes o la obesidad. El poli nucleótido recombinante puede estar en la forma de un vector de terapia del gen, por ejemplo un vector de terapia del gen viral, también conocido por los expertos en la técnica.

Un aspecto adicional del método de la invención para identificar un compuesto que activa a AMPK o al miembro de la subfamilia de AMPK por un mecanismo similar a la metformina o fenformina o ribosida de AICA, en el cual el efecto de un compuesto de prueba en la activación de AMPK o de un miembro de la subfamilia de AMPK por una preparación o complejo o célula de la invención, se compara con el efecto de la metformina o fenformina o ribosida de AICA en la activación de AMPK o de un miembro de la subfamilia de AMPK, y se selecciona un compuesto con un efecto similar. Tal método puede ser útil en determinar si un compuesto es más potente que la metformina o fenformina o ribosida de AICA.

Por el término “anticuerpo” se incluyen anticuerpos sintéticos y fragmentos y variantes (por ejemplo según lo discutido anteriormente) de anticuerpos enteros que retienen el antígeno en el sitio de enlace. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, pero puede también ser una preparación de anticuerpo policlonal, una parte o parte de éste (por ejemplo un fragmento de Fab o F(ab')₂) o un anticuerpo sintético o parte de éste. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, ScFv y dAb pueden todos ser expresados en y segregados del *E. coli*, permitiendo así la producción fácil de cantidades grandes de dichos fragmentos. Por “moléculas de ScFv” se significa las moléculas en donde los dominios compañeros VH y VL se unen por la vía de un oligopéptido flexible. Se prefieren los anticuerpos clase IgG.

Los anticuerpos monoclonales convenientes para los antígenos seleccionados pueden ser preparados por las técnicas conocidas, por ejemplo aquellas descritas en “Anticuerpos Monoclonales”: Un manual de técnicas, H. Zola (CRC Press, 1988) y en “Anticuerpos Monoclonales del Hibridoma: Técnicas y Aplicaciones”, JGR Hurrell (CRC Press, 1982), modificado según lo indicado anteriormente. Anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados por fusión celular, por la reasociación de fragmentos monovalentes o por entrecruzamiento químico de los anticuerpos enteros. Se

describen métodos para preparar los anticuerpos biespecíficos en Corvalen *et al*, (1987) Cancer Immunol. Immunother. 24, 127-132 y 133-137 y 138-143.

Una revisión general de las técnicas involucradas en la síntesis de fragmentos del anticuerpo que retienen los sitios de enlace específicos se encontrarán en Winter y Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

La invención se describe ahora además haciendo referencia a las Figuras y Ejemplos siguientes, no limitantes.

Leyendas de las figuras

Figura 1. *Asociación de MO25 α con LKB1*. (A) Los lisados celulares derivados del control parental de células de HeLa o células de HeLa expresando establemente el Terminal-N del epítipo Flag-marcado del LKB1 tipo natural (WT) o el cinasa inerte (KD) del LKB1 se pasaron a través de una columna de agarosa por afinidad al anti-Flag M2-, la elución del LKB1 eluido con los péptidos de Flag, y las muestras se concentraron según lo descrito en Materiales y Métodos. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida y las bandas de proteína visualizadas siguiendo la mancha azul coloidal. Se indican las bandas de la proteína, únicas para las preparaciones WT y KD del LKB1. (B) Las bandas coloreadas de azul-coloidal designadas según lo indicado en (A) fueron escindidas desde el gel, digeridas las proteínas en el gel con tripsina, y sus identidades fueron determinadas por la huella dactilar de la masa-espectral del péptido triptico. La identidad de STRAD α y MO25 α fue confirmada por el análisis de la secuencia LC-MS/MS en un espectrómetro de masa Q-TOF2. Se indican el número de péptidos tripticos, el porcentaje de cobertura de la secuencia y los números gi de NCBI para cada proteína identificada. (C) Las muestras purificadas en (A) fueron inmunotransferidas con los anticuerpos indicados. Resultados idénticos se obtuvieron siguiendo 2 purificaciones independientes del LKB1 desde las células de HeLa.

Figura 2. *Modelos de la secuencia del aminoácido y distribución del tejido de las isoformas de MO25 α y MO25 β* . (A) La alineación de la secuencia del aminoácido de las isoformas del MO25 α humano (número de acceso NCBI NP_057373) y MO25 β (número de acceso NCBI Q9H9S4) así como del *C. elegans* MO25 α (NCBI número de acceso CAB 16486) y de MO25 β (número de acceso NP_508691) y los homólogos putativos de Drosophila MO25 (NCBI número de acceso P91891). Se embalan los residuos conservados en negro, y los residuos homólogos están sombreados en gris. Las alineaciones de la secuencia se realizaron utilizando los programas de CLUSTALW y BOXSHADE en <http://www.ch.embnet.org/using> los parámetros estándar. (B) un fragmento 32P-marcado del cADN de MO25 fue usado para sondear una transferencia Northern conteniendo el poliadenilato de ARN aislado de los tejidos humanos indicados. La membrana fue auto radiografiada, y la sonda del MO25 α fue observada para hacer híbrido a un mensaje 4.2-kb, idéntico al tamaño predicho por el mensaje de MO25 α desde el análisis de la base de datos. Como un control de la carga, la transferencia Northern se hizo híbrida con una sonda β -actina. (C y D) Los extractos del tejido del ratón indicado (C) o célula (D) que contienen 20 μ g de la proteína celular total fueron inmunotransferidos con los anticuerpos anti-MO25 α y anti-MO25 β .

Figura 3. *El LKB1 endógeno se asocia con MO25 α* . (A) El LKB1 fue inmunoprecipitado desde 2 mg de los lisados indicados que usan 10 μ g del anticuerpo anti-LKB1 acoplado de forma covalente a la proteína G-Sefarosa, y los inmunoprecipitados fueron inmunotransferidos con los anticuerpos indicados. Como un control, se realizaron también en paralelo las inmunoprecipitaciones en experimentos con los anticuerpos preinmunes IgG acoplados de forma covalente a la proteína G-Sefarosa. En cada gel, unos 20 μ g del lisado total de la célula también fue inmunotransferido en paralelo. (B) MO25 α fue inmunoprecipitado como anteriormente, excepto que se emplearon 15 μ g del anticuerpo de MO25 α . Los resultados mostrados son de un solo experimento que fue repetido 3 veces con resultados similares.

Figura 4. *MO25 α se asocia con LKB1 a través de STRAD α* . (A) 293 células fueron transfectadas con los plásmidos puestos en código para la expresión de las proteínas de fusión indicadas GST junto con Myc-MO25 α . 36 h post transfección, las proteínas designadas GST fueron por afinidad purificadas desde los lisados celulares usando el glutatión-Sefarosa según lo descrito en Materiales y Métodos. Cantidades similares de las proteínas de fusión purificadas-GST se sometieron a electroforesis SDS-gel poliacrilamida y fueron inmunotransferidas con el anticuerpo anti myc para detectar Myc-MO25 α copurificado, o con el anticuerpo anti-GST para asegurar que cantidades comparables de las proteínas del GST unido estuvieran presentes en cada sonda (paneles superior y medio). También, previo a la purificación por afinidad, se sometieron 5 μ g de los lisados totales de la célula a la inmunotransferencia con el anticuerpo anti myc para asegurar que Myc-MO25 α fuera expresado a niveles similares en cada cotransfección (panel más bajo). (B) El LKB1 del GST unido de Terminal-N se expresó en 293 células en la presencia o ausencia de Flag-STRAD α y fue purificado como anteriormente. Las proteínas purificadas se sometieron a electroforesis SDS-gel de poliacrilamida y se visualizaron por la coloración azul coloidal (panel superior). La banda de la proteína débil indicada, que corresponde a una proteína endógena de 40-kDa (marcado *), se identificó por la huella dactilar de la masa-espectral del péptido triptico como el endógenamente expresado MO25 α (con 38% de cobertura de secuencia). Las proteínas purificadas también fueron inmutransferidas con los anticuerpos indicados (paneles inferiores). (C) Como anteriormente, sólo que GST-LKB1 se expresó en 293 células junto con las isoformas indicadas de Flag-STRAD y Myc-MO25 y las proteínas visualizadas por la coloración azul coloidal también fueron inmunotransferidas con los anticuerpos indicados. Para todos los paneles, se obtuvieron resultados similares en por lo menos 3 experimentos separados.

Figura 5. *MO25 α y STRAD α fijan LKB1 en el citoplasma*. Las células de HeLa fueron transfectadas con las estructuras indicadas codificando para la expresión de Myc-MO25 α , Flag-STRAD α y GFP-LKB1. 24 h post transfecciones las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (por volumen) e inmunocoloreadas con el anticuerpo anti-MO25 α

para detectar MO25 α (anticuerpo secundario del TR anti-carnero, canal rojo) y anti-Flag para detectar STRAD α (anticuerpo secundario del Cy5n anti-ratón, canal azul). La localización de GFP-LKB1 se visualizó directamente a través de la fluorescencia de GFP (canal verde). Las células fueron retratadas usando un microscopio con focal Zeiss LSM 510 META. Las células mostradas son las imágenes representativas obtenidas en 3 experimentos separados. Las barras de la balanza corresponden a 10 μ m.

Figura 6. *MO25 reconoce los 3 residuos de Terminal-C de STRAD α* . (A) STRAD α del tipo natural unido al terminal-N de GST o los mutantes indicados de STRAD α se expresaron en 293 células junto con Myc-MO25 α , y 36 h post transfección las proteínas de STRAD α fueron purificadas por afinidad desde los lisados celulares usando glutatión-Sefarosa. Cantidades similares de las proteínas purificadas se sometieron a electroforesis SDS-gel de poliacrilamida y fueron inmunotransferidas con el anticuerpo anti myc para detectar Myc-MO25 α copurificado, o con el anticuerpo anti-GST para asegurar que cantidades comparables de las proteínas del GST unido estuvieran presentes en cada senda (paneles superior y medio). También, previo a la purificación por afinidad, se sometieron 5 μ g de los lisados totales de la célula a la inmunotransferencia con el anticuerpo anti myc para asegurar que Myc-MO25 α fuera expresado a niveles similares en cada condición (panel inferior). (B) 0.5 mg de los lisados celulares indicados se incubó con 5 μ g de un péptido biotinilado de terminal-N que abarca o el terminal-C de 12 residuos de STRAD α conjugado al estreptavidina-Sefarosa (NLEELEVDWDF, nombrado STRAD α -C12, o mutantes de este péptido en el cual los residuos indicados fueron mutados individualmente a Ala. Seguido al aislamiento y lavado de las cuentas, las muestras se sometieron a electroforesis SDS-gel de poliacrilamida y fueron inmunotransferidas con un anticuerpo anti-MO25. (C) El enlace de MO25 α bacterianamente expresado a los péptidos indicados se analizó por la resonancia de superficie de plasmón. El análisis de BiaCore según lo descrito en Materiales y Métodos. El enlace se analizó sobre un rango de concentraciones de MO25 (6.25-3200 nM) y el nivel de respuesta en el estado estacionario del enlace se graficó contra el logaritmo de la concentración del MO25 α . El Kd estimado para el péptido de STRAD α -C12 se obtuvo introduciendo los datos en la fórmula $[ml \times m0/(m0+m2)]$ usando el software de Kaleidagraph y el Kd fue calculado para ser 850 nM. WEF-C12 corresponde a NLEELEVDWDF, WEA-C12 corresponde a NLEELEVDWDEA, AEF-C12 corresponde a NLEELEVDDEAF, WAF-C12 corresponde a NLEELEVDWAF, WEF-C6 corresponde a VDDWDF.

Figura 7. *Enlace de LKB1 a STRAD α crea el nuevo sitio de enlace(s) para MO25 α* . Las formas indicadas de GSTSTRAD α fueron coexpresadas en 293 células junto con Myc-MO25 α y/o el tipo natural Flag-LKB 1 o el dominio catalizador de LKB 1 aislado (LKB1 [44-343]. 36 h post-transfección, las proteínas de GST-STRAD fueron purificadas por afinidad, sometidas a electroforesis SDS-gel de poliacrilamida y fueron inmunotransferidas con el anticuerpo anti myc para detectar Myc-MO25, el anticuerpo anti-Flag para detectar copurificado Flag-LKB 1 y Flag-LKB 1 [44-343], o con el anticuerpo anti-GST para detectar formas de STRAD α (paneles superiores). También, previo a la purificación por afinidad, se sometieron 5 μ g de los lisados totales de la célula a la inmunotransferencia con los anticuerpos anti myc y anti-Flag para asegurar que MO25 α y LKB fueran expresados a niveles similares en cada cotransfección (paneles inferiores). Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos separados.

Figura 8. *Las isoformas de MO25 estabilizan el complejo de LKB10STRAD α* . (A) 293 células fueron transfectadas con 3 μ g de la estructura del ADN codificando para la expresión de GST-LKB1, en la presencia o ausencia de 3 μ g de Flag-STRAD α y en la ausencia o presencia de cantidades indicadas de la estructura de Myc-MO25. 36 h post-transfección, GST-LKB1 fue purificado por afinidad desde los lisados celulares e inmunotransferido con los anticuerpos del epítipo apropiado para detectar LKB1, STRAD α y MO25 α . 5 μ g de lisados totales de la célula, previo a la purificación por afinidad, también fueron inmunotransferidos con los anticuerpos indicados (paneles inferiores). (B) Se realizó como anteriormente sólo que se empleó la estructura de MO25 β en lugar de la estructura del MO25 α . Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos separados.

Figura 9. *Activación de LKB1 por asociación con las isoformas de STRAD e MO25*. 293 células fueron transfectadas con las estructuras codificando GST-LKB1 en la presencia o ausencia de estructuras que ponen en código las isoformas indicadas de STRAD y MO25. 36 h post-transfección, GST-LKB1 fue purificada por afinidad y ensayada para autofosforilación y transfosforilación de MBP según lo descrito en los materiales y métodos. Las reacciones fueron sometidas a electroforesis y el gel auto radiografiado (panel superior). La fosforilación de MBP por LKB 1 a Tr65 también se supervisó por inmunotransferencia con un anticuerpo fosfoespecífico (T65-P), el cual reconoce el fosforilado de MBP por LKB1 en su residuo. Cada reacción también fue inmunotransferida con los anticuerpos del apéndice del epítipo apropiado para supervisar los niveles de LKB1, STRAD, e isoformas de MO25. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos separados.

Figura 10. *Alineación de secuencia de aminoácido de isoformas de STRAD con los parientes de STE20-cinasas más próximos*. (A) La alineación de secuencia de aminoácido del STRAD α humano (NCBI número de acceso AAG48269) y STRAD (NCBI número de acceso AAM19143) con SPAK humano (número de acceso NCBI AAC72238) y OSR1 humano (NCBI número de acceso NP_005100). Los residuos conservados se embalan en negro, y los residuos homólogos están sombreados en gris. El Asp catalizador (subdominio VI) y Asp-Phe-Gly (subdominio VII) presente en el SPAK activo y en las proteinocinasas del OSR1, pero faltantes en las pseudocinasas del STRAD α y del STRAD β se embalaron y marcaron con un asterisco. El Terminal-C del Trp-Glu-Phe motivo presente en STRAD y STRAD que corresponde a una secuencia de Phe-Glu-Phe en SPAK y OSR1 son embalados y marcados con triángulos y los sitios de fosforilación de LKB1 en STRAD α (Tr329 y Tr419) (Baas *et al.*, 2003) se marcan con flechas. Se realizaron las alineaciones de la secuencia usando los programas de CLUSTALW y BOXSHADE en <http://www.ch.embnet.org/> usando los parámetros estándar.

Figura 11. Las isoformas de MO25 incrementan la expresión de STRAD β y la formación del complejo de LKB1-STRAD β . (A) 293 células fueron transfectadas con 3 μ g de la estructura del ADN codificando para la expresión de GST-LKB1, en la presencia o ausencia de 3 μ g de la estructura de Flag-STRAD β y en la ausencia o presencia de cantidades indicadas de la estructura de Myc-MO25 α . 36 h post-transfección, GST-LKB1 fue purificado por afinidad desde los lisados celulares e inmunotransferidos con los anticuerpos del epítipo apropiado para detectar LKB1, STRAD β y MO25 α . 5 μ g de los lisados totales de la célula, previo a purificación por afinidad también fueron inmunotransferidos con los anticuerpos indicados (paneles inferiores). (B) Se realiza como anteriormente excepto que se empleó la estructura de MO25 β en lugar de la estructura de MO25 α . Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos separados y también cuando STRAD β se expresó como una proteína de fusión-GST en el vector del pEBG-2T en lugar del vector del pCMV5 (datos no mostrados).

Figura 12: Alineación de las secuencias del aminoácido de Tos3, Pak1 y Elml desde la levadura y LKB 1 y CaMKK β (variante β 3) desde los humanos. La alineación se creó usando PILEUP desde la serie GCH [49] y la secuencia consenso fue determinada y agregada coloreando usando BOXSHADE v3.2.1 [50]. Los residuos en los cuales son idénticas por lo menos la mitad de las secuencias están coloreados en gris, con los cambios conservadores también en gris. La secuencia consenso está representada por letra mayúscula si el residuo en una posición particular es idéntico en todas las secuencias, y por una letra minúscula si por lo menos se conserva la mitad. Sólo se muestran las regiones centrales conservadas que contienen los dominios del cinasa (residuos 50-310 de LKB 1 aprox.).

Figura 13: Dos AMPKKs pueden resolverse de los extractos del hígado de la rata pero los dos son complejos entre LKB1, STRAD α , y MO25 α . (A) Separación de dos actividades que activan el dominio catalizador de GST-AMPK α 1 por el cromatógrafo de Q-Sefarosa. El gráfico muestra la actividad de AMPKK en fracciones (círculos abiertos, absorbancia a 280 nm (línea continua) y la conductibilidad en el eluato (línea discontinua). El eje "x" representa el número de la fracción (fracciones de 4.5 ml). B, C, D: examinado los sustratos de fracciones de la columna después de SDS-PAGE (1 μ l por senda) usando el anti-LKB1 (B), anti-STRAD α (C) y anti-MO25 α (D). E, F, G: Se concentraron fracciones 26-30 desde 4.5 ml hasta 250 μ l usando concentradores centrífugos Amicon Ultra-4 30,000 MWCO, y 2 μ l fue cargado por senda. Continuando, los geles de SDS-PAGE se transfirieron a nitrocelulosa y las membranas sondeadas con el anti-LKB1 (E), anti-STRAD α (F) y anti-MO25 α (G).

Figura 14: La actividad de AMPKK, y los polipéptidos de LKB1, STRAD α y MO25 α , pueden ser inmunoprecipitados desde AMPKK1 y AMPKK2 del hígado de la rata usando el anticuerpo anti-LKB 1. (A) Detención de la actividad del AMPKK desde el sobrenadante. El LKB anti-humano de la oveja o la inmunoglobulina de control preinmune (IgG) fue preligado a las cuentas de Proteína G-Sefarosa y entrecruzado con DMP como se describió previamente [51], excepto que se realizó un lavado final de las cuentas con 100 mM de glicina, pH 2.5. Anticuerpos liga-cuenta (40 Pl) se incubaron con la fracción máxima de AMPKK1 (0.04 Unidades), AMPKK2 (0.03 Unidades) o el complejo GST-LKB1:STRAD α :MO25 α recombinante (0.06 Unidades) durante 20 minutos y las cuentas fueron removidas en una micro centrífuga (14,000xg, 2 min.). Se determinó la actividad de AMPKK en los sobrenadantes y se expresa como un porcentaje del valor obtenido usando el control IgG. (B) Las pelotillas del experimento en (A) fueron resuspendidas en el volumen original y las muestras de los sobrenadantes y pelotillas analizadas por la prueba de transferencia Western con el anticuerpo anti-LKB1. El LKB1 recombinante emigra a una masa molecular más alta debido al apéndice de GST (C) Como A, sólo que la cantidad de AMPKK1, AMPKK2 y complejo de GST-LKB1:STRAD α :MO25 α recombinante se aumentó a 0.44, 0.70 y 1.4 Unidades respectivamente, y las actividades fueron determinadas en las pelotillas resuspendidas. En este experimento la cantidad de anticuerpo fue limitante de modo que solamente una porción de la actividad fue precipitada. (D) Las pelotillas del experimento en (C) fueron resuspendidas y las muestras analizadas por la prueba de transferencia Western con los anticuerpos anti-LKB1, anti-STRAD α y anti-MO25 α .

Figura 15: Los complejos recombinantes de LKB1-STRAD-MO25 pueden activar eficazmente el AMPK por la vía de la fosforilación a Tr-172. (1): las combinaciones indicadas del LKB 1 tipo natural GST-apendizado (WT, sendas 1-9), o cinasa inerte (D194A, KD, sendas 10-13) el mutante de LKB1, o GST-solo (senda 14), Flag-apendizado STRAD α o STRAD β , y myc-apendizado MO25 α o MO25 β fueron coexpresados en las células de HEK-293T, purificados en glutatión-Sefarosa y probadas para su habilidad para activar el dominio catalizador de GST-AMPK α 1 (panel superior). Las muestras de cada incubación también se analizaron por la prueba de transferencia Western y sondeadas usando los anticuerpos indicados (de la cima al fondo): anti-pT172, anti-AMPK 1 dominio catalizador (GST-1), anti-GST para detectar GST-LKB1, anti-FLAG para detectar STRAD α y STRAD β , y d anti myc para detectar MO25 α y MO25 β . Todas las proteínas emigraron con la movilidad esperada, teniendo en cuenta los apéndices del epítipo. Las tres transferencias del fondo fueron conducidas en las reacciones del blanco carente del dominio catalizador del GST-AMPK, ya que el último parecía causar alguna interferencia con la detección. (B): el complejo de GST-LKB1:STRAD α :MO25 α recombinante se usó para fosforilar el tipo natural GST- α 1 dominio catalizador (GST-1-WT) o un mutante de T172A (GST- α 1-T172A) usando [γ -32]ATP como se describió en Métodos. La reacción se analizó por SDS-PAGE y auto radiografía. Las flechas muestran la migración de GST-LKB 1 (el cual autofosforila) y GST- α 1 dominio catalizador.

Figura 16: Activación y fosforilación de los complejos heterotriméricos de AMPK por AMPKK1, AMPKK2 y los complejos de GST-LKB1:STRAD α :MO25 α recombinantes. Los complejos recombinantes α 1 β 1 γ 1 o α 2 β 1 γ 1 se incubaron por 10 min. con MgATP y AMPKK1 (2.8 o 1.4 unidades/ml), AMPKK2 (10.3 o 5.15 unidades/ml) o GST-LKB1:STRAD α :MO25 α (14.3 o 7.2 unidades/ml), y se determinó la actividad de AMPK. Dos veces tanto cinasa a contracorriente se adicionó cuando el complejo α 1 β 1 γ 1 era el sustrato, tal como los experimentos modelos mostraron

que éste se activó menos rápidamente. Las imágenes son de las transferencias Western experimentadas con el anticuerpo fosfoespecífico anti-pT172 (panel superior), y con una mezcla de anticuerpos anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ para demostrar la carga uniforme de los complejos $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ o $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ (note que el anticuerpo anti- $\alpha 2$ siempre da una señal más fuerte que el anti- $\alpha 1$, incluso para cargas iguales de proteína).

Figura 17: La actividad de AMPKK endógeno puede ser inmunoprecipitada de 293 células que usan el anticuerpo LKB1, pero la actividad puede ser sólo inmunoprecipitada de las células de HeLa si ellas expresan LKB1 establemente (pero no un mutante catalíticamente-inactivo) desde un promotor inducible. LKB1 fue inmunoprecipitado desde 0.5 mg del extracto celular derivado desde las células no-transfectadas de HEK-293T (sendas 1,2), células de HeLa no-transfectadas (sendas 3,4), o células de HeLa que expresan establemente el LKB1 tipo natural (WT) (sendas 5,6) o un mutante (D194A) del cinasa inerte (KD) del LKB1 (sendas 7,8) de un promotor inducible. La inmunoprecipitación fue con el anti-LKB1 (sendas 1, 3, 5, 7) o una inmunoglobulina de control preinmune (IgG, sendas 2, 4, 6, 8).

Se usaron muestras de cada inmunoprecipitado para ensayar la activación de GST-AMPK $\alpha 1$ -dominio catalizador, para analizar la fosforilación de GST-AMPK $\alpha 1$ -dominio catalizador en Tr-172 (medio del panel), y para determinar la recuperación de LKB1 (fondo del panel). Las muestras de cada inmunoprecipitado también fueron inmunotransferidas por la presencia de los STRAD α y MO25 α endógenos con los anticuerpos apropiados. También mostrada en el tope del panel está la actividad basal obtenida cuando el GST-AMPK $\alpha 1$ -dominio catalizador se incubó con MgATP solo (sin adición).

Figura 18: La restauración de la habilidad de AMPK para ser activado por ribosida AICA y fenformina en las células HeLa por expresión de LKB1. Las células HeLa de control (sendas 1, 2, 3), las células de HeLa que expresan el LKB1 tipo natural (WT) (sendas 4,5,6) y el cinasa inerte (D194A, KD) del mutante de LKB1 (sendas 7, 8, 9) fueron dejados sin estimular o tratados con 2 mM de ribosida AICA o 10 mM de fenformina por 60 min. y lisado. (A) El AMPK endógeno fue inmunoprecipitado desde los extractos de la célula y ensayado. (B) la célula de los lisados fue inmunotransferida con los anticuerpos que reconocen el AMPK $\alpha 1$ fosforilado a Tr172 o AMPK $\alpha 1$ total; los resultados se analizaron usando el procesador de imagen LI-COR IR OdysseyTM como se describió debajo en Materiales y Métodos, y se expresan como una proporción de las dos señales. (C) La célula de los lisados se analizó por la prueba de transferencia Western y las membranas se examinaron con los anticuerpos que reconocen el ACC fosforilado a Ser-79, o estreptavidina para determinar el AMPK $\alpha 1$ total. Los resultados se analizaron usando el procesador de imagen de IR LI-COR como para (B).

Figura 19: Alineación secuencial de las secuencias del bucle de activación de los cinasas de la subfamilia de AGC (PKA α y PKC α , los cuales se piensa que no son activados por el LKB1) con los residuos del bucle-T de las proteinocinasas de la subfamilia de AMPK/SNF1. Los métodos y representación son según lo descrito en la Figura 1. Los residuos de treonina que corresponden al Tr-172 de AMPK ("P") y otros residuos mencionados en el texto se indican con flechas descendentes. Todas las secuencias son de humanos, excepto AtSnRK1- $\alpha 1$, AtSnRK1- $\alpha 2$ y ScSnf1, los cuales son homólogos de AMPK del *Arabidopsis thaliana* (AtSnRK1, cinasa-1 de SNF1-relacionado) y del cerevisiae *Saccharomyces* (ScSnf1). Aunque los homólogos del humano, *Arabidopsis*, y *S. cerevisiae*, así como los cinasas el PKA α y de PKC α , se conoce que son activados por la fosforilación del residuo de treonina equivalente a Tr-172, todavía tiene que ser establecido si los otros miembros de la subfamilia de AMPK (NuaK1, NuaK2, BrsK1, BrsK2, SIK, QIK, QSK, MELK) se activan por la fosforilación de este residuo, y si los complejos de LKB1-STRAD-MO25 pueden mediar esta fosforilación.

Figura 20: El K_m y V_{max} para un sustrato del péptido (denominado AMPKtido). Se describen las condiciones del ensayo en el Ejemplo 3.

Fig. 21. Activación de los cinasas del AMPK-relacionado por LKB1. (A) El dendrograma y las secuencias del bucle-T de las proteinocinasas de la subfamilia de AMPK/SNF1 (Manning *et al.*, 2002). Los residuos idénticos se somborean en negro y los residuos conservados en gris. Tr y Ser del bucle-T se indican con un asterisco. (B) Los cinasas del AMPK-relacionado indicados fueron incubados con los complejos LKB1:STRAD:MO25 tipo natural (cuadrados abiertos) o LKB1[D194A]:STRAD:MO25 catalíticamente inactivo (círculos abiertos) en la presencia de Mg²⁺ y ATP. En los tiempos indicados, la actividad de los cinasas del AMPK-relacionado se ensayó con el péptido de AMARA y los resultados se expresan como actividad específica. Los resultados mostrados son los promedios $\pm$ DS de ensayos llevados a cabo por triplicado y representativos de dos experimentos independientes. Las barras del error sólo se muestran cuando son mayores que el tamaño de los cuadrados abiertos.

Fig. 22. La activación eficiente de los cinasas AMPK-relacionado por LKB1 requiere STRAD y subunidades de MO25. Las combinaciones indicadas de LKB1 GST-apendizado tipo natural (WT, sendas 1-9), o LKB1 catalíticamente inactivo (D194A, sendas 10-13), o GST solo (senda 14), STRAD α o STRAD β Flag-apendizado, y MO25 α o MO25 β myc-apendizado fueron coexpresados en las células de HEK-293T y purificados en glutatión-Sefarosa. Los complejos se probaron para su habilidad a activar el dominio catalizador de AMPK $\alpha 1$ o de los cinasas de AMPK-relacionados indicados. Los resultados se expresan como actividad específica empleando el péptido de AMARA como sustratos. Los resultados mostrados son los promedios $\pm$ DS de ensayos llevados a cabo por triplicado y representativos de dos experimentos independientes. También se analizaron las muestras de cada incubación por la prueba de transferencia Western y fueron examinadas usando los anticuerpos indicados (del tope al fondo): anti-GST para detectar LKB1; anti-Flag para detectar STRAD α y STRAD β ; y anti myc para detectar MO25 α y MO25 β . Todas las proteínas emigraron con la movilidad esperada, teniendo en cuenta los apéndices del epítipo.

Fig. 23. *El Tr del bucle-T es el sitio de mayor fosforilación de LKB1 en los cinasas del AMPK-relacionado.* Los mutantes tipo natural (WT) y Tr del bucle-T a Ala (Tr→Ala) de los cinasas indicados del GST-AMPK-relacionado, se incubaron con el complejo LKB1:STRAD:MO25 en la presencia de Mg²⁺ y [γ 32P]ATP. La fosforilación de los sustratos de la proteína fue determinada por electroforesis en un gel de poliácridamida y el auto radiografía subsiguiente de las bandas coloreadas de azul de Coomassie que corresponden a cada sustrato. Un alícuota de cada incubación también se analizó por la prueba de transferencia Western examinando con un anticuerpo anti-HA para asegurar igual carga de los cinasas de tipo natural y los del mutante de AMPK-relacionado (los cuales todos poseen un apéndice del epítipo de HA). Todas las proteínas emigraron con la movilidad esperada, teniendo en cuenta los apéndices del epítipo. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos separados.

Fig. 24. *Efecto de la mutación del Tr en el bucle-T sobre la activación de los cinasas del AMPK-relacionado por LKB1.* Los cinasas indicados tipo natural (WT) del AMPK-relacionado o mutantes de estas enzimas en las cuales el Tr del bucle-T fue cambiado a Ala (T/A) o Glu (T/E), se incubaron en la ausencia (-) o presencia (+) de LKB1:STRAD:MO25 tipo natural en la presencia de Mg²⁺ y ATP. Después de 30 min., los cinasas del AMPK-relacionado se ensayaron con el péptido de AMARA y los resultados se expresan como actividad específica. Los resultados mostrados son los promedios $\pm$ DS de ensayos llevados a cabo por triplicado y representativos de dos experimentos independientes. Un alícuota de cada incubación también se analizó por la prueba de transferencia Western examinando con un anticuerpo anti-HA para asegurar igual carga de los cinasas de tipo natural y los del mutante de AMPK-relacionado (los cuales todos poseen un apéndice de HA).

Fig. 25. *Análisis de la fosforilación y activación de los cinasas MARK.* (A) El MARK3[D196A] catalíticamente inactivo (KI), que no puede autofosforilarse y los mutantes indicados, se incubaron con el complejo LKB1 durante 30 min. con Mg²⁺ - [γ 32P]ATP y se separaron por electroforesis en un gel de poliácridamida, el cual fue después auto-radiografiado. Las proteínas de MARK3 32P-marcado se digirieron con la tripsina y los péptidos 32P-marcados fueron cromatografiados en una columna de C18. Se muestran las fracciones que contienen el péptido del tríptico 32P-marcado del bucle-T (Péptidos PA y PB). (B) Los péptidos PA y PB se sometieron a la secuencia de fase sólida y la 32P-radioactividad fue medida después de cada ciclo de degradación de Edman. En combinación con el espectrómetro de masa MALDI TOF-TOF, esto posibilitó la identificación de los sitios fosforilados en cada péptido. Los péptidos PA comprenden el péptido de MARK3 bucle-T fosforilado a Tr211 y Ser215, y los péptidos PB el péptido de MARK3 bucle-T fosforilado a Tr211. (C a F) El tipo natural indicado (WT) o las formas mutantes de los cinasas MARK en los cuales el Tr o Ser del bucle-T fue mutado a Ala (T/A, S/A) o a Glu (T/E, S/E), se incubaron en la ausencia (-) o presencia (+) de LKB1 tipo natural: STRAD:MO25 en la presencia de Mg²⁺ y ATP. Después de 30 min., los cinasas de MARK se ensayaron usando el péptido AMARA, y los resultados se expresan como actividad específica. Un alícuota de cada incubación también se analizó por la prueba de transferencia Western sondeando con un anticuerpo anti-HA para asegurar igual carga de los cinasas de tipo natural y los del mutante de MARK (los cuales todos poseen un apéndice del epítipo de HA). Los resultados mostrados son los promedios $\pm$ DS de un ensayo triplicado y representativos de por lo menos dos experimentos independientes. (G) MARK4 fue fosforilado con el complejo LKB 1 como en A y el mayor péptido 32P-marcado se analizó por la secuencia fase sólida de Edman como en (B). En combinación con el espectrómetro de masa MALDI TOF-TOF (Fig. 30C), se demostró que este péptido comprende el bucle-T de MARK4 fosforilado sólo en el residuo de Tr.

Fig. 26. *Identificación de los sustratos del péptido para LKB1.* (A) Se realizó el análisis cinético de la fosforilación del bucle-T indicado para el complejo de LKB1:STRAD:MO25. El residuo de Tr del bucle-T en cada péptido se subraya y en caracteres en negrita y 3 residuos de Arg se agregaron al término C de cada péptido del bucle-T para habilitar su captura en el papel de fósforocelulosa p81. Los valores de Km y Vmax fueron determinados de la regresión no-lineal. (B) Un alícuota de cada péptido fosforilado por el complejo de LKB1 se sometió a la secuencia de la fase sólida de Edman y la 32P-radioactividad se midió después de cada ciclo de degradación de Edman. Una proporción pequeña de cada péptido puede acoplarse a la membrana de arilamina Sequelon a través de los residuos ácidos internos de Asp y Glu en lugar de su terminal-C del grupo carboxilo. Esto se considera por las pequeñas descargas aparentes de 32P-radioactividad que se observa en algunos residuos de Asp y Glu. (C) Las mismas combinaciones de LKB1 GST-apendizado tipo natural (WT, sendas 1-9), LKB1 catalíticamente inactivo (D194A, sendas 10-13), o GST solo (senda 14), STRAD α o STRAD β Flag-apendizado, y MO25 α o MO25 β myc-apendizado empleado en la Fig. 22, se probaron para su habilidad a fosforilar los péptidos indicados (concentración del péptido 200 μ M). Los resultados se expresan como la actividad del cinasa del péptido generada por mg de LKB1:STRAD:MO25 agregado al ensayo. Los resultados mostrados son los promedios $\pm$ DS de 3 ensayos y son representativos de por lo menos dos experimentos independientes.

Fig. 27 *Actividad de los cinasas AMPK-relacionado en LKB1+/+ y LKB1-/MEFs.* LKB1+/+ o LKB1-/MEFs fueron dejados sin tratar (barras negras) o estimulados con 10 mM de fenformina (Fen, barras blancas) por 1 h. Los cinasas de AMPK α 1 y AMPK-relacionados fueron inmunoprecipitados desde la célula de los lisados, y se midió *in vitro* la actividad del cinasa hacia el péptido de AMARA según lo descrito en Materiales y Métodos (Ejemplo 4). Para confirmar igual expresión de los cinasas en cada muestra, los lisados celulares (AMPK α 1, NUA2, MARK2/3 y MARK4) o las proteínas inmunoprecipitadas (QIK, QSK, SIK y MARK1) fueron sometidas a SDS-PAGE y al análisis de la prueba de transferencia Western. Todas las cinasas relacionadas con AMPK migraron con la masa molecular esperada. En el caso de AMPK α 1, los lisados celulares fueron inmunotransferidos con un anticuerpo de fósforoTr172 (P-AMPK), que reconoce el bucle-T fosforilado. Un control de los niveles de inmunotransferencia del LKB1 en la célula de los lisados también se incluye en el panel B. Los resultados mostrados son los promedios $\pm$ DS de 2-4 ensayos y son representativos por lo menos de dos experimentos independientes.

Fig. 28. *El ribosida de AICA no activa los cinasas del AMPK-relacionado.* (A) LKB1+/+ MEFs fueron dejados sin tratar o estimulados con las concentraciones indicadas de fenformina (Fen) por 1 h. AMPK α 1/ α 2 y LPKB1 fueron inmunoprecipitados desde la célula de los lisados, y se midió *in vitro* la actividad del cinasa hacia los péptidos AMARA y LKBtido respectivamente, según lo descrito en Materiales y Métodos (Ejemplo 4). (B) En cada muestra, los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE y al análisis de la prueba de transferencia Western con los anticuerpos indicados. El anticuerpo fósforo pT172 (P-AMPK) reconoce el bucle-T fosforilado de AMPK α 1. Los resultados mostrados son el promedio $\pm$ DS para un ensayo triplicado y son representativos de dos experimentos independientes. (C) LKB1+/+ MEFs fueron dejados sin tratar (barras negras) o estimulados con 2 mM de ribosida de AICA (AICAR, barras blancas) por 1 h. Los cinasas de AMPK α 1 y los indicadores de AMPK-relacionado fueron inmunoprecipitados desde la célula de los lisados, y se midió *in vitro* la actividad del cinasa hacia el péptido de AMARA según lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se presentan como % relativo a la actividad observada en las células no-estimuladas, y son los promedios $\pm$ SEM de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a las actividades absolutas siguientes; AMPK α 1; 135 mU/mg, NUA2; 0,25 mU/mg, QIK; 0,76 mU/mg, SIK; 2,73 mU/mg; MARK1; 0,14 mU/mg, MARK2/3; 3,5 mU/mg y MARK4; 1,6 mU/mg. (D) La inmunotransferencia de AMPK se realizó como en A.

Fig. 29. *Actividad de los cinasas AMPK-relacionado en las células de HeLa.* La expresión de LKB1 carente (-) de las células de HeLa de control, o las células de HeLa que expresan establemente el tipo natural de LKB 1 (WT) o el cinasa inactivo de LKB 1 (KI), o fueron dejados sin tratar (barras negras) o estimulados con 10 mM de fenformina (Fen, barras blancas) por 1 h. Los cinasas de AMPK α 1 y AMPK-relacionado fueron inmunoprecipitados desde la célula de los lisados, y se midió *in vitro* la actividad del cinasa hacia el péptido de AMARA según lo descrito en Materiales y Métodos (Ejemplo 4). Para confirmar igual expresión de los cinasas en cada muestra, los lisados celulares (AMPK α 1, MARK2/3 y MARK4) o las proteínas inmunoprecipitadas (NUAK2, QIK, QSK, SIK y MARK1) fueron sometidas a SDS-PAGE y al análisis de inmunotransferencia Western. Todos los cinasas de AMPK-relacionado emigraron con la masa molecular esperada. En el caso de AMPK α 1, los lisados celulares fueron inmunotransferidos con un anticuerpo del pTr172 (PAMPK), que reconoce el bucle-T fosforilado. Los resultados mostrados son los promedios $\pm$ DS de 2-4 ensayos y son representativos de al menos dos experimentos independientes.

Fig. 30. *Análisis de la fosforilación de BRSK2, NUA2 y MARK4 y MELK.* (A) Los mutantes catalíticamente inactivos de BRSK2[D159A] y NUA2[D193A], que son incapaces de autofosforilarse, se incubaron con el complejo LKB1 por 30 min. con Mg2+ - [yγ32P]ATP y fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida que fue después auto radiografiado. Las proteínas 32P-marcadas se digirieron con tripsina y los péptidos resultantes fueron cromatografiados en una columna de C18. Los fragmentos que contienen los péptidos 32P-marcados mayores son marcados. (B) Los Péptidos P1, P2, y P3 se sometieron a secuenciación de fase sólida y la 32P-radioactividad se midió después de cada ciclo de degradación de Edman. Nosotros fuimos incapaces de determinar la identidad del péptido de NUA2 indicada con “?”. (C) Los péptidos indicados fueron analizados por espectrometría de masa MALDI TOF-TOF según lo descrito anteriormente. Se indican la secuencia del aminoácido deducido y el sitio de fosforilación, junto con la masa observada y teórica. El péptido marcado “MARK4” se derivó del fosforilado de MARK4 por LKB 1 según lo descrito en la leyenda para la Fig. 25G. Este péptido abarca el bucle-T del fosforilado de MARK4 sólo en el residuo de Tr. El péptido marcado “MELK” se deriva de un compendio del tríptico del MELK no marcado que se había expresado y se había purificado del *E. coli* según lo descrito anteriormente. Este péptido abarca el bucle-T del fosforilado de MELK en el residuo de Tr. Las abreviaturas: m, sulfato de metionina; (p) indica el residuo precedente de Tr que es fosforilado.

Ejemplo 1

Las isoformas de MO25 actúan recíprocamente con las pseudocinasas de STRAD α / β STE20-relacionado y refuerzan su habilidad para entrelazar, activar y localizar el LKB1 supresor del tumor en el citoplasma

Las mutaciones en la proteinocinasa del LKB 1 producen el Síndrome del Cáncer de Peutz Jeghers heredado. La investigación hasta la fecha ha indicado que el LKB 1 funciona como una proteína supresora del tumor, pero todavía se conoce poco sobre cómo el LKB1 es regulado. El reciente trabajo reveló que el LKB1 puede activarse a través de su interacción con el STE20-relacionado, la pseudocinasa catalíticamente inactivo denominado STRAD α y que esta interacción se requirió por LKB1 para suprimir el crecimiento celular. En este Ejemplo nosotros hemos encontrado que el complejo de LKB1-STRAD α endógeno inmunoprecipitado desde las células de varios mamíferos también está asociado con una proteína 40 kDa de función desconocida, conteniendo dominios funcionales no identificables, denominados MO25 α . Nosotros mostramos que MO25 α no liga directamente a LKB1 pero en cambio se asocia con LKB1 a través de su interacción con STRAD α . MO25 α reconoce específicamente los últimos 3 residuos de STRAD α (Trp-Glu-Phe) cuando la mutación o truncamiento de estos aminoácidos logra abolir la interacción de STRAD α con MO25 α . Los estudios de localización celular indican que MO25 α y STRAD α forman un complejo citoplasmático que fija a LKB1 en el citoplasma, excluyéndolo del núcleo. La cantidad de LKB1 asociado con STRAD α en las células se incrementa notablemente por sobre expresión de MO25 α , sugiriendo que el MO25 α refuerza la formación del complejo LKB1-STRAD α *in vivo*. Nosotros también establecemos que la asociación de LKB1 con STRAD α y MO25 α estimula la actividad catalizadora de LKB1 casi en 10 veces. Es más, nosotros proporcionamos la evidencia de que la isoforma estrechamente relacionada de STRAD α (también conocida como ILPIP o cinasa de PAP), que nosotros nombramos STRAD β , y las isoformas de MO25 β también pueden estabilizar LKB1 en un complejo activo, y nosotros demostramos que es posible aislar los complejos heterotriméricos de LKB 1 ligados a STRAD y a las isoformas

de MO25, en los cuales las subunidades están presentes en cantidades equimolares. Nuestros resultados indican que el MO25 puede funcionar como un componente del andamiaje del complejo LKB1-STRAD y puede jugar un papel crucial en regular la actividad de LKB1 y la localización celular mediados por su interacción con los pseudocinasas de STRAD.

Resultados

Identificación de MO25 α en un complejo de LKB1

Para identificar las proteínas asociadas con LKB1, hemos utilizado las células de HeLa previamente descritas, que expresan establemente niveles bajos de LKB1 del tipo natural o catalíticamente inactivo con un apéndice del epítipo de Flag de Terminal-N para habilitar la inmuno purificación fácil de las proteínas LKB1-asociadas que emplean el anticuerpo de Flag (Boudeau *et al.*, 2003a). Flag-LKB1 fue inmuno purificado desde un centenar de platos de 10 centímetros del lisado de la célula de HeLa derivado de las células que expresan el LKB1 tipo natural o el cinasa inerte de LKB1, o del control parental de la línea celular de HeLa que no expresa LKB1 (vea Materiales y Métodos). Las preparaciones se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida, la cual se tiñó con azul coloidal (Fig. 1A). Una muestra de la preparación del cinasa inerte de LKB1 también se concentró más aun para habilitar la visualización de las proteínas menos abundantes. Se observaron varias bandas que estaban presentes en ambas preparaciones de LKB1, la del tipo natural y la del cinasa inerte, pero estaban ausentes en la muestra del control (Fig. 1A). Se estableció la identidad de las bandas coloreadas de azul coloidal marcadas en la Figura 1A, por los procedimientos que toman las huellas dactilares de la masa-espectral del péptido del tríptico (Fig. 1B), y se confirmó por inmunotransferencia con los anticuerpos apropiados (Fig. 1C). Fueron detectadas las proteínas previamente establecidas por estar asociadas con LKB1, incluyendo las proteínas acompañantes Hsp90 y Cdc37 (Boudeau *et al.*, 2003a) y STRAD α (Baas *et al.*, 2003). Además, se identificó una proteína de ~40 kDa como MO25 α coinmuno purificada con ambos LKB1, el tipo natural y el del cinasa inerte, pero no estaba presente en la purificación del control (Fig. 1A y 1C).

MO25 α se identificó primero como un gen expresado en la fase de la segmentación temprana de embriogénesis del ratón (Miyamoto *et al.*, 1993) y fue mostrado por ser una proteína conservada muy evolutiva (Karos y Fischer, 1999; Nozaki *et al.*, 1996) para que ninguna función celular se le haya atribuido. Del análisis de la base de datos, hemos identificado una isoforma estrechamente relacionada de MO25 α que nosotros denominamos MO25 β , y una alineación de la secuencia de ambas isoformas de MO25 junto con sus homólogos putativos en *Drosophila* y *C. elegans* se muestra en la Figura 2A. El análisis de la prueba de transferencia Northern indicó que MO25 α es ampliamente expresado en los tejidos humanos, con los niveles más altos de expresión en el músculo del esqueleto (Fig. 2B). El análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo cultivado contra la proteína de MO25 α , la cual no reacciona en cruce con MO25 β (Fig. 2C y D), y el análisis de la base de datos EST (Tabla 1) confirmó que MO25 α se expresa en muchos tejidos y líneas de la célula. Aunque nosotros fuimos incapaces de detectar niveles significantes de MO25 β ARN por el análisis de la prueba de transferencia Northern, la inmunotransferencia que usa un anticuerpo cultivado contra la proteína de MO25 β que no reacciona en cruce con MO25 α , sugirió que MO25 β también se expresa en una variedad de tejidos y líneas de la célula probadas (Fig. 2D). Esto es consistente con la observación de que las secuencias de MO25 β EST han sido identificadas de varios tejidos humanos (Tabla 1). Sin embargo, la expresión de MO25 β puede restringirse más que MO25 α , ya que él no se detectó en el hígado y varias líneas de la célula incluso las células de HeLa (Fig. 2D), explicando quizás por qué él no se copurificó con el LKB1 expresado en estas células (Fig. 1).

TABLA 1

Origen del tejido de ESTs codificando MO25 α y MO25 β humano

Proteína	NCBI Asentimiento del tejido	
MO25 α	duodeno, adenocarcinoma	NM_016289
	leiomioma	BM474393, BU167673, BE884976
	carcinoma embrional	BQ433499, BM905560, BG259357
	carcinoma celular escamoso	BG679680
	melanoma melanótico	BQ432236
	adenocarcinoma mamario	BM013638, BG034567
	leucemia crónica del linfático	AI760873
	carcinoma del ductal	BU190932

Proteína		NCBI Asentimiento del tejido
5	osteosarcoma	BG108474
	adenocarcinoma	BG250662, BG121835, AW188515
	condrosarcoma metastático	CA436298
	carcinoma epitelioide	BQ433038
	retinoblastoma	BM480142
10	neuroblastoma	BE383169
	útero, tumor	BF095794
	melanoma melanótico	BE891921, B0231688
	astrocitoma	BM913690, BM560554
	papiloma celular de transición	G260085
15	tumor de la piel	AA379224
	testis	BG773506, BG719459
	comprensivo del tronco	BQ718408
	tuétano	BI019682, BI019684
	pigmentado normal del retiniano del epitelio	BG750933, M050770
20	cerviz	BI089979
	hipotálamo	AV722015, AV729226
	cerebro fetal	BM927264, AA351866
	senescentes de los fibroblastos	W47588
	infantil del cerebro	AA434013, R21390, R46486
25	célula B del centro germinal	AA280522, AA280264, AA262054
	tumor ovárico	AA442950, A165271, A164403
	placenta	R67490, R66347, BG435220
	osteosarcoma	BG025988
	pecho, normal	BE004664, AW373436
30	bazo fetal del hígado	T86658, T86848
	cerviz	BE538532
	estómago	BM822360, BM833391, BM766941
	ojos fetales	BM711209
	islote pancreático purificado	BU079122, BU078843
35	próstata, normal	BE835801
	pulmón	BM979124, BM982100, BM985320
	riñón	AW235071, AA961656
	próstata	BF680686
	placenta, coriocarcinoma	BC010993, BE281207, BF107447
40	teratocarcinoma	AU125107, AU148840, AK022639
	paratiroides, tumor	W37952
	nervio ciático	BQ899617
	célula de B germinal del centro	AA278473, AA279145
	tumor del pulmón	BF879769
45	carcinoma epidermoide	BQ669953
	pulmón, normal	BF845952, BE042886
	colon	BE928225, AW008806
	condrosarcoma metastático	BQ021348
	fibrosarcoma	CA441154
50	riñón	AW242839
	estómago	BM820071, BM831835, BM822014
	hígado y bazo	AI247543
	testículos	AA781806
	páncreas	AI956166
	retina	AA001436, AA018841

55 *MO25α* endógeno está presente en el complejo con *LKB1* endógeno. Nosotros luego inmuno precipitamos el *LKB1* endógeno desde 293 células (Fig. 3A, panel izquierdo) o las células Rata-2 (Fig. 3A, panel derecho), seguido por la inmunotransferencia por *LKB1*, *STRADα* y *MO25α*. Los experimentos mostraron que *MO25α*, así como *STRADα*, fueron coimmunoprecipitados con *LKB1*, pero no con el preinmune IgG. Nosotros también inmuno precipitamos *MO25α* endógeno desde 293 células (Fig. 3B, panel izquierdo) o las células Rata-2 (Fig. 3B, panel derecho), e inmuno transferimos por la presencia de *LKB1*, *STRADα* y *MO25α* (Fig. 3B). *LKB1* endógeno y *STRADα* fueron coimmunoprecipitados con *MO25α*, pero no con el preinmune IgG, consistente con la noción de que estas proteínas forman un complejo.

MO25 actúa recíprocamente con STRAD en lugar de con LKB1

65 Para verificar qué componente del complejo *LKB1*-*STRAD* interactuó con *MO25α*, nosotros cotransfectamos 293 células con estructuras que expresan *MO25α* y cualquier Terminal-N de glutatión S-transferasa (GST) apéndice de *LKB1*, *STRADα* o el pseudocinasa de *STRADβ* estrechamente relacionado, así como *Cdc37*, un acompañante pre-

viamente mostrado para ligar LKB1 (Boudeau *et al.*, 2003a). Una alineación de la secuencia de STRAD α y STRAD β se muestra en la Figura 10 y a ambos les falta los mismos residuos conservados claves en el subdominio VI y VII en el dominio del cinasa que se requieren para la catálisis. Los GST-apéndices de las proteínas fueron por afinidad purificados e inmunotransferidos para MO25 α (Fig. 4A). Nosotros encontramos que MO25 α sólo actúa recíprocamente con STRAD α y STRAD β pero no con LKB1 o Cdc37.

Nosotros luego expresamos LKB1 en 293 células en la presencia o ausencia de STRAD α , y la composición de la proteína de la afinidad purificada LKB1 se analizó llevando a cabo la electroforesis y coloreado con el azul coloidal. Como era esperado, STRAD α se copurificó con LKB1. Sin embargo, además, una banda débilmente coloreada que corresponde a un endógeno de la proteína de ~40 kDa se observó en el complejo de LKB1-STRAD α , el cual no estaba presente en la preparación de LKB1 no acomplexado. Las huellas dactilares espectrales de los péptidos tripticos revelaron que esta proteína correspondió a MO25 α endógeno. Esto fue confirmado por inmunotransferencia con un anticuerpo anti-MO25 α (Fig. 4B), sugiriendo además que el MO25 α está asociado con LKB1 a través de STRAD α . En la Figura 4C, nosotros demostramos realizando cotransfecciones apropiadas, que es posible purificar un complejo heterotrimérico LKB1 en el cual están presentes LKB1, STRAD α y MO25 α en proporciones equimolares equivalentes. Nosotros también demostramos que es posible formar complejos similares de LKB1-STRAD α -MO25 β , LKB1-STRAD β -MO25 α y LKB1-STRAD β -MO25 β (Fig. 4C), indicando que ambas isoformas de STRAD y MO25 pueden ligarse mutuamente, así como LKB1.

MO25 α coopera con STRAD α para localizar LKB1 en el citoplasma

Las fracciones citoplasmáticas de LKB1 fue demostrado recientemente para dirigir una detención de la célula G1 (Tiainen *et al.*, 2002). Por consiguiente, nosotros estábamos interesados en estudiar cómo la formación de un complejo de LKB1, STRAD α y MO25 α afectaba la localización de estas proteínas. Las células de HeLa fueron transfectadas con las combinaciones de los apéndices de MO25 α , STRAD α y LKB1 y estas proteínas se visualizaron en las células por la microscopía de fluorescencia con focal en la cual las proteínas de MO25 α , STRAD α y LKB1 podrían detectarse independientemente en la misma célula. MO25 α (Fig. 5A) y STRAD α (Fig. 5E) expresado solo fue localizado a lo largo del citoplasma y núcleo. Notablemente sin embargo, cuando se coexpresaron MO25 α y STRAD α , ambas proteínas fueron re-localizadas en el citoplasma y se excluyeron del núcleo (Fig. 5G y 5H). Como se informó previamente en las células de COS, el LKB1 expresado exclusivamente era principalmente nuclear (Fig. 5L) y la coexpresión con STRAD α promovió la localización citoplasmática significativa de LKB1, sin embargo niveles significantes de LKB1 permanecían en el núcleo bajo estas condiciones (Fig. 5O) (Baas *et al.*, 2003). No obstante, en la presencia de ambos, MO25 α y STRAD α , LKB1 estaba esencialmente localizado sólo en el citoplasma y virtualmente excluido del núcleo (Fig. 5R). Estas observaciones indican que MO25 α y STRAD α forman un complejo que fija el LKB1 en el citoplasma más eficazmente que el STRAD α exclusivamente.

MO25 α reconoce los últimos 3 residuos de STRAD α

Para definir el sitio de enlace de MO25 α en STRAD α , una serie de mutaciones de la delección de STRAD α se probó para su habilidad de actuar recíprocamente con MO25 α en un ensayo de enlace por cotransfección. Notablemente, la delección de sólo los últimos 3 aminoácidos de STRAD α (Trp-Glu-Phe) abolió la liga de MO25 α a STRAD α . Es más, mutación del Terminal-C del residuo de Trp a Phe, también redujo inmensamente la liga de MO25 α a STRAD α (Fig. 6A). Nosotros probamos entonces si era posible por afinidad purificar que MO25 α expresado endógenamente desde los lisados celulares de 3 mamíferos diferentes empleando los péptidos biotinilados que abarcan los residuos del Terminal-C de STRAD α conjugados al estreptavidina-Sefarosa. Nosotros encontramos que un péptido que abarca el Terminal-C de 12 residuos (Fig. 6B) pero no los últimos 6 residuos (datos no mostrados y Fig. 6C) de STRAD α eficazmente purificó MO25 α endógeno desde todos los lisados celulares probados (Fig. 6B). Además para delinear el sitio de enlace de MO25 α en el péptido de STRAD α , nosotros realizamos un examen de alanina examina, mutando cada residuo del péptido individualmente a Ala y verificando cómo esto afectó la liga a MO25 α (Fig. 6B). Consistente con los residuos de Trp-Glu-Phe que se requieren para el reconocimiento de MO25 α , la mutación de cualquiera de estos 3 residuos en el péptido de STRAD α de terminal-C abolió o redujo inmensamente la liga de MO25 α en 3 lisados celulares diferentes, mientras que la mutación de los otros residuos o no afectó el enlace o sólo tuvo un efecto moderado. Estos resultados también fueron confirmados en ensayo más cuantitativo del enlace de Biacore por una resonancia de plasmón de superficie (Fig. 6C).

La liga de LKB1 a STRAD α crea el nuevo sitio(s) de enlace para MO25 α

Nosotros después investigamos cómo la liga de LKB1 a STRAD α afectó la interacción con MO25 α usando una coexpresión del ensayo de enlace en 293 células en las cuales la longitud completa llena del tipo natural y los mutantes de la delección de GST-STRAD α se coexpresaron en la presencia o ausencia de MO25 α y LKB1. Consistente con los resultados anteriores, los mutantes de STRAD α que les faltaba o el terminal-C 12 o 48 residuos no ligaron MO25 α en la ausencia de LKB1 (Fig. 7, panel 1). Notablemente sin embargo, cuando estos mutantes de STRAD α fueron coexpresados con LKB1, MO25 α se recuperó en los complejos purificados (Fig. 7, panel 2), indicando que la liga de LKB1 a STRAD α genera el sitio(s) de enlace adicional para MO25 α dentro del complejo de LKB1-STRAD α . Nosotros notamos también de forma consistente que la cantidad de LKB1 recuperado en el tirón de GST-STRAD α baja fue significativamente superior en la presencia de MO25 α (Fig. 7, compare paneles 2 y 3), sugiriendo que MO25 α podría estabilizar la formación de un complejo heterotrimérico LKB1. Es más, un fragmento catalizador de LKB1 que abarca sólo el dominio del cinasa (residuos 44-343) actuó recíprocamente mucho más eficazmente con STRAD α

en la presencia de MO25 α (Fig. 7, compare paneles 4 y 5). Estas observaciones indican que MO25 α podría ser el estabilizador del complejo de LKB1-STRAD α generando sitio(s) de enlace adicional de MO25 α en STRAD α y/o LKB1. Sin embargo, un mutante de STRAD α que le falta el terminal-C de 88 residuos que truncan una región del dominio del pseudocinasa, fue incapaz de interactuar con LKB 1 o MO25 α cuando estas proteínas fueron coexpresadas (Fig. 7). Esto sugirió que o un sitio de enlace secundario de MO25 α secundario se localiza hacia el término C de STRAD α o que la integridad del dominio del pseudocinasa, la cual podría romperse por el truncamiento de los 88 residuos de terminal-C de STRAD α , se requiere para habilitar la formación del complejo heterotrimérico de LKB1-STRAD α -MO25 α .

Evidencia adicional de que MO25 estabiliza el complejo de LKB1-STRAD

Para obtener evidencia adicional de que MO25 α pudiera estabilizar la ligazón de LKB1 a STRAD α , 293 células fueron cotransfectadas con estructuras que expresan LKB 1 y STRAD α en la ausencia o presencia de cantidades crecientes la estructura de ADN del MO25 α . LKB 1 fue purificado y los niveles de STRAD α asociado y MO25 α fueron medidos por inmunotransferencia. Como un control, los niveles de expresión de LKB1, STRAD α y MO25 α también fueron medidos en la célula de los lisados previo a la purificación por afinidad de LKB1. En la ausencia de MO25 α , una cantidad moderada de STRAD α fue asociada con LKB1, la cual se reforzó notablemente por el incremento de la expresión de MO25 α en una manera dependiente de la dosis (Fig. 8A, panel superior). La asociación incrementada de STRAD α con LKB 1 no fue debido a la expresión incrementada de LKB 1 o STRAD α ya que éstos se expresaron en los lisados celulares a niveles similares en la ausencia o presencia de cantidades crecientes de MO25 α (Fig. 8A, panel inferior). MO25 β pudo similarmente reforzar la interacción entre LKB 1 y STRAD α (Figura 8B). Nosotros también investigamos cómo MO25 α y MO25 β estabilizaron la ligazón de LKB1 a STRAD β (Fig. 11). Ninguna asociación perceptible de STRAD β a LKB 1 se observó en la ausencia de MO25, cuando por el contrario la coexpresión de MO25 α o STRAD β resultaba en una dosis dependiente del aumento en STRAD β ligando a LKB1. Sin embargo, en contraste con STRAD α , los niveles la expresión de STRAD β en 293 células fueron bajos en la ausencia de isoformas de MO25 y significativamente incrementaron en su presencia, lo cual podría explicar la ligazón incrementada de LKB1 a STRAD β en la presencia de isoformas de MO25 (Fig. 2 Suplementario). Se obtuvieron resultados similares cuando STRAD β se expresó como una proteína de fusión-GST desde un vector de expresión distinto (datos no mostrados).

Estabilización del complejo de LKB1-STRAD por las isoformas de MO25 correlaciona con la actividad incrementada

Para determinar cómo la ligazón de MO25 α y MO25 β al complejo de LKB1-STRAD α o LKB1-STRAD β afectó la actividad de LKB1, 293 células fueron transfectadas con el tipo natural GST-LKB1 en la presencia o ausencia de isoformas de STRAD y/o MO25. La actividad de cantidades iguales de GST-LKB1 purificado por afinidad se evaluó midiendo la actividad de la auto fosforilación así como la transfosforilación de la proteína básica de la mielina (MBP), un sustrato exógeno no-específico de LKB1, en la presencia de [γ -32P]ATP. Nosotros también supervisamos la fosforilación de MBP usando un anticuerpo fósforo específico que reconoce el sitio de mayor fosforilación de LKB1 en MBP (Tr65) (Baas *et al.*, 2003). Los ensayos de actividad diferente de LKB1 dieron resultados comparables (Fig. 9). En la ausencia de isoformas de STRAD, LKB 1 fue pobremente activo (Fig. 9, senda 1) y, como se mostró previamente (Baas *et al.*, 2003), la coexpresión con STRAD α indujo un aumento de ~4 veces en la actividad de LKB 1 (Fig. 9, senda 2). En la presencia de STRAD α y MO25 α o MO25 β , la actividad de LKB1 se aumentó ~ unas 2 veces adicional para que LKB1 se volviera ~9 veces más activo que LKB1 expresado exclusivamente (Fig. 9, sendas 6 ó 7). LKB1 sólo se activó por STRAD β en la presencia de isoformas de MO25 (Fig. 9, compare sendas 3 con sendas 8 y 9), consistente con la observación de que LKB1 está escasamente asociado con STRAD β en la ausencia de MO25 (Fig. 11). LKB 1 se mostró previamente para fosforilar STRAD α (Baas *et al.*, 2003), y nosotros mostramos que el aumento de MO25-mediado en la asociación de STRAD α a LKB1 resulta en la fosforilación incrementada de STRAD α (Fig. 9, compare sendas 2 con 6 y 7). En contraste para STRAD α , STRAD β no fueron significativamente fosforilados por LKB1 en la presencia de MO25 (Fig. 9, sendas 8 y 9). LKB1 fosforila de STRAD α a Tr329 y Tr419 (Baas *et al.*, 2003), sitios que no se conservan en STRAD β (Fig. 10). Esto explica por qué STRAD β no es fosforilado por LKB1. Nosotros también mostramos que el LKB1 inactivo catalíticamente puede asociarse con ambas isoformas de STRAD en la presencia de cualquier isoforma de MO25. Sin embargo, como era esperado, éste es incapaz de autofosforilarse o fosforilar STRAD α o MBP (Fig. 9, sendas 10-13).

Discusión

Uno de los resultados mayores de este estudio es el descubrimiento de que la proteína de MO25 α muy conservada se encontró en muchas especies del eucariota a la cual ninguna función se había atribuido previamente, está presente en un complejo con STRAD α y LKB1 *en vivo*. Interesantemente, en la ausencia de LKB1, MO25 α reconoce específicamente los últimos 3 aminoácidos de STRAD α que están en una secuencia de Trp-Glu-Phe, y la mutación de cualquiera de estos 3 residuos a Ala previno esencialmente la ligazón de MO25 α a STRAD α . En este aspecto, MO25 α funciona semejantemente a un PDZ del dominio que también reconoce el terminal-C extremo de los residuos de su proteína que liga los acompañantes (Songyang *et al.*, 1997). Sin embargo, no hay ninguna homología entre el PDZ del dominio y MO25 α y, por nuestro conocimiento, otros dominios caracterizados de esta manera remotamente no poseen esta propiedad. El terminal-C del dominio del no-pseudocinasa ~50 residuos de STRAD α y STRAD β se conservan pobremente pero, significativamente, ambos terminan con la secuencia de Trp-Glu-Phe (Fig. 10), acentuando que STRAD α y STRAD β probablemente han evolucionado para interactuar especialmente con las isoformas de

MO25. Las proteínas más estrechamente relacionadas a STRAD α y STRAD β son las cinasas del miembro activo de STE20 denominados SPAK (Johnston *et al.*, 2000) y OSR1 (Tamari *et al.*, 1999), que poseen todos los residuos requeridos para la catálisis de la proteinocinasa (Fig. 10) y son por consiguiente enzimas activas. Aunque ni SPAK ni OSR1 terminan en una secuencia de Trp-Glu-Phe, ambos poseen una secuencia de Phe-Glu-Phe en una región similar de su dominio no-catalizador del terminal-C (Fig. 10). Esta observación nos incitó a deformar el terminal-C de la secuencia de Trp-Glu-Phe de STRAD α a Phe-Glu-Phe y nosotros encontramos que esto le impidió a MO25 α ligar a STRAD α (Fig. 6A). Esto enfatiza aun más que la presencia de un residuo de Trp de tres residuos del final de la proteína es esencial para la ligazón de STRAD α a MO25 α , sugiriendo que MO25 α no actuará recíprocamente con SPAK u OSR1.

Nuestros datos indican que uno de los papeles importantes de MO25 α es estabilizar la interacción entre LKB1 y STRAD α . Esto está basado en la observación de que la cantidad de STRAD α asociado con LKB1 en las células se refuerza significativamente por la expresión de MO25 α (Fig. 8). El hallazgo de que STRAD α carente del terminal-C de los residuos de Trp-Glu-Phe puede formar un complejo con MO25 α en la presencia de LKB1 (Fig. 7) indica que la interacción de LKB1 con STRAD α genera nuevo sitio(s) de enlace para MO25 α , lo cual podría explicar cómo MO25 α estabiliza la asociación de LKB1 con STRAD α . Nuestros resultados no nos permiten diferenciar si los sitio(s) de enlace adicional de MO25 α se localizan dentro de STRAD α y/o LKB1. Se requerirán estudios estructurales detallados de este complejo dirigido a este problema. Nuestras observaciones son consistentes con la noción de que MO25 α o MO25 β pueden funcionar como un componente del andamiaje del complejo de LKB1-STRAD.

Se ha mostrado previamente que la coexpresión de STRAD α con LKB1 reforzó LKB1 en la actividad *in vitro* (Baas *et al.*, 2003) y aquí nosotros demostramos que la asociación de LKB1-STRAD con las isoformas de MO25 reforzó además la actividad de LKB1 en dos veces (Fig. 9). Estos resultados indican que la estabilización del complejo de LKB1-STRAD α por MO25 está acompañada por la activación de LKB1. Pretenciosamente, sin embargo, debe notarse que el complejo de LKB1 y STRAD α purificado desde 293 células del mamífero sobre-expresando los LKB1 y STRAD α apendizados también está asociado con los niveles significantes de MO25 α endógeno (Fig. 4B). No es por consiguiente posible medir la actividad del complejo de LKB1-STRAD α en la ausencia de MO25 α por la expresión de estas proteínas en las células del mamífero. Por tanto no podemos cuantificar cómo la asociación de STRAD α con LKB1 en la ausencia total de MO25 α afecta la actividad de LKB1. Para superar el problema de la asociación de STRAD α sobre expresado con MO25 α endógeno en las células del mamífero, nosotros hemos intentado combinar *E. coli* expresado de LKB1, STRAD α , y MO25 α para ver si nosotros pudiéramos formar un complejo en el cual LKB1 podría activarse. Sin embargo, este acercamiento fue infructuoso (datos de JB no mostrados), lo que indica que la asociación de LKB1 con STRAD α y MO25 α es un proceso complicado que puede requerir factores adicionales y/o que este complejo puede necesitar ser congregado *en vivo*. Nosotros fuimos capaces de aislar desde las células del mamífero un complejo heterotrimérico en el cual están presentes LKB1, STRAD y subunidades de MO25 en una estequiometría similar (Fig. 4C), haciéndonos pensar en una afinidad relativamente alta de las subunidades individuales para nosotros.

Nosotros también demostramos que MO25 α y STRAD α , cuando se expresaron exclusivamente en las células, están ambos localizados en el citoplasma y el núcleo, pero ellos sólo se localizan en el citoplasma y se excluyeron del núcleo cuando se expresan juntos (Fig. 5). El mecanismo molecular que está detrás de esta observación no se ha investigado. Es posible que la interacción de MO25 α y STRAD α lleva al enmascaramiento de una señal de localización nuclear, exposición de una nueva señal de exportación nuclear o citoplasmática fijados al motivo, o que el complejo de STRAD α -MO25 α es tan grande para libremente translocarse en el núcleo. Bajo las condiciones nosotros hemos realizado nuestros estudios de localización en las células de HeLa, nosotros encontramos que MO25 α significativamente coopera con STRAD α para localizar LKB1 en el citoplasma de las células, excluyéndolo del núcleo, puesto que la exclusión nuclear y localización citoplasmática de LKB1 observados siguiendo la expresión de LKB1 y STRAD α fue notablemente reforzada en la presencia de MO25 α (Fig. 5). Los estudios anteriores en las células de COS también mostraron que STRAD α podía localizar LKB1 en el citoplasma de las células (Baas *et al.*, 2003). Sin embargo, como nuestros datos indican que niveles significantes de MO25 α endógeno ligará al complejo de LKB1-STRAD α (Fig. 4B), no es posible gobernar fuera que las isoformas de MO25 endógeno puedan contribuir a la localización citoplasmática del LKB1 cuando es cotransfectado con STRAD α . La localización citoplasmática de LKB1 puede ser importante, cuando los mutantes de LKB1 que no pueden entrar en el núcleo todavía suprimen el crecimiento celular (Tiainen *et al.*, 2002). También pueden existir mecanismos adicionales para mantener LKB1 en el citoplasma celular. Se ha demostrado que la interacción de LKB1 con la proteína de LIP1 induce la localización citoplasmática de LKB1 (Smith *et al.*, 2001). Tiene que ser probado todavía si LIP1 puede actuar recíprocamente con el complejo heterotrimérico de LKB1-STRAD-MO25, pero no se ha reportado que LIP1 influya sobre la actividad de LKB1. LKB1 también está prenilado en su término C (Collins *et al.*, 2000; Sapkota *et al.*, 2001), lo cual podría promover las interacciones con las membranas celulares. El reciente trabajo ha indicado que la prenilación del homólogo de LKB1 de *Drosophila* es importante para la asociación de LKB1 con las membranas en controlar la polaridad celular (Martin y St Johnston, 2003).

No sólo se encuentran los homólogos de MO25 putativos en los mamíferos, sino *Drosophila* y *C. elegans* también se encontraron en la fisión de la levadura (número de acceso NCBI NP_594685, 51% de identidad para MO25 α humano), gemación de la levadura (HYM1, número de acceso NCBI P32464, 33% de identidad para MO25 α humano) y planta (número de acceso NCBI Q9M0M4, 43% de identidad para MO25 α humano). Hasta nuestro conocimiento sólo el homólogo de MO25 de la gemación de la levadura putativa nombrado HYM1, se ha investigado y al parecer juega un papel importante en regular el crecimiento celular polarizado y la separación de la célula (Bidlingmaier *et al.*, 2001; Dorland *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 2002). Hasta nuestro conocimiento, no se han reportado homólogos de LKB1 y

STRAD en la levadura y por lo tanto no está claro si pudiera haber un eslabón entre LKB1 que regula la polaridad en el *C. elegans* y *Drosophila* (Martin y St Johnston, 2003; Watts *et al.*, 2000) y HYM1 que regula la polaridad celular en la levadura.

También es posible que M025 pudiera tener funciones que son independientes de su habilidad para regular LKB1. M025 podría actuar recíprocamente con otras proteínas que terminan en un motivo similar a STRAD α /STRAD β y hay sobre 20 proteínas humanas que terminan en un motivo de Trp-Glu/Asp-Phe. Puede ser interesante investigar si cualquiera de éstos liga las isoformas de M025. También es probable que STRAD α y STRAD β tengan otras funciones que no sean la de regular LKB1. En este sentido, trabajo reciente ha demostrado que la sobre expresión de STRAD β en 293 células las protegió contra el apoptosis por el reforzamiento de la habilidad de la senda de JNK a ser activada por la sobre expresión de XIAP, un componente a contracorriente de la senda de JNK (Sanna *et al.*, 2002). Es más, en otro estudio, se reportó que la sobre expresión de STRAD β conduce a la activación de los cinasas de JNK y p38 γ MAP (Nishigaki *et al.*, 2003). El mecanismo por el cual STRAD β reforzó la activación de JNK/p38 γ no se definió en estos estudios y sería de interés probar si LKB1 y/o M025 está envuelto en estos procesos.

Un número significativo de formas heredadas de PJS encontrado en ciertas familias no exhibe las mutaciones en los genes de LKB1 (Buchet-Poyau *et al.*, 2002), indicando que hay un segundo lugar causativo para PJS. El análisis genético hasta la fecha ha excluido LIP1 y no proporcionó evidencia de que otras proteínas reportadas para actuar recíprocamente con LKB 1 sean deformadas en estos pacientes (Buchet-Poyau *et al.*, 2002; Resta *et al.*, 2002). Los resultados en este estudio indican que valdría la pena verificar si las mutaciones en los genes que ponen en código STRAD o las isoformas de M025 ocurren en cualquiera de las familias de PJS que no tienen mutaciones en el gen de LKB 1.

En conclusión nosotros definimos M025 como un nuevo componente del complejo LKB1 *en vivo*. Nuestros resultados indican que las isoformas de M025 funcionan para estabilizar la interacción de LKB 1 con las isoformas del pseudocinasa de STRAD catalíticamente inactivo. Esto refuerza notablemente la actividad de LKB1 y su localización citoplasmática. En los estudios futuros para definir además las funciones fisiológicas de los homólogos de M025 y de STRAD en regular la función de LKB1, también sería importante generar ratones carentes de estos genes. La habilidad de expresar formas más activas de complejos heterotriméricos de LKB 1 abre también la oportunidad de emplear los acercamientos bioquímicos para buscar nuevos sustratos de LKB1.

Materiales. Se obtuvieron tabletas del cocktail de inhibidor de proteasa desde Roche. El pimelimidato de dimetilo y el gel de afinidad a anti-Flag M2-agarosa se compró desde Sigma. El suero bovino fetal de tetraciclina-libre (FBS) fue desde Perbio, y otros reactivos de cultivo de tejido fueron desde Biowhittaker a menos que se declaró en otro caso. Los geles premoledados SDS/4-12% y 10% de poliacrilamida Bis-Tris y la proteína básica de la mielina (MBP) se obtuvieron desde Invitrogen. Los slip sensores SA fueron desde BiaCore AB (Stevenage, Reino Unido). [γ -32P]ATP, Glutación-Sefarosa, Proteína G-Sefarosa, y Estreptavidina-Sefarosa de alta acción se compraron desde Amersham Biosciences.

Péptidos. Los péptidos biotinilados de STRAD α -C12 (Biotin-C6spacer-NLEELEVDWDF), y STRAD α -C6 (Biotin-C6spacer-VDDWDF) cuyas secuencias abarcan el último 12, y 6 residuos de STRAD α respectivamente, el péptido de Flag (DYKDDDDK), y los péptidos usados para cultivar los anticuerpos fueron sintetizados por Dr G. Bloomberg (Universidad de Bristol, Reino Unido). Los péptidos biotinilados que abarcan los últimos 12 residuos de STRAD α en los cuales cada residuo fue reemplazado individualmente por una Alanina, se sintetizaron usando la metodología previamente descrita (Lizcano *et al.*, 2002).

Anticuerpos. El anticuerpo de LKB1 usado para la inmunotransferencia se cultivó contra la proteína de LKB1 del ratón según lo descrito previamente (Sapkota *et al.*, 2001). Como este anticuerpo no precipita eficazmente la proteína de LKB1 humano, nosotros cultivamos un anticuerpo en la oveja contra la proteína de LKB1 humana expresada como una proteína de fusión GST en el *E. coli* que eficazmente inmuno precipitó LKB 1 humano y de la rata. Este anticuerpo se usó para todos los experimentos de inmunoprecipitación en este estudio. Se cultivaron los anticuerpos anti-MO25 α y anti-MO25 β en la oveja contra las proteínas del MO25 α y MO25 β humanas expresado en el *E. coli* según lo descrito abajo. Se purificaron por afinidad los anticuerpos de LKB1 y M025 en el CH-Sefarosa acoplado covalentemente al antígeno de la proteína usado para cultivar el anticuerpo. El anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína de STRAD α se ha descrito previamente (Baas *et al.*, 2003). El anticuerpo fósforo-específico que reconoce el fosforilado de MBP a Tr65 (T65-P) se cultivó en la oveja contra el péptido GHHAARTTHYGSLPQ que corresponde a los residuos 58-72 de bovino MBP en el cual el residuo subrayado es fósforotreonina. El anticuerpo se purificó por afinidad en CH-Sefarosa acoplado covalentemente al péptido fosforilado y después pasado a través de una columna de CH-Sefarosa acoplado al péptido no-fosforilado. El anticuerpo que no ligó en la última columna fue seleccionado. Los anticuerpos monoclonales que reconocen los apéndices de GST y del epítipo de Flag se obtuvieron desde Sigma, el anticuerpo monoclonal que reconoce el apéndice del epítipo de Myc, se compró desde Roche, y los anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa del rábano picante usado para la inmunotransferencia se obtuvieron por Pierce. El IgG preinmune usado en los experimentos de inmunoprecipitación de control se obtuvo del suero preinmune que emplea la proteína G-Sefarosa.

Métodos generales y tampones. La restricción de la enzima que digiere, las ligaduras de ADN, y otros procedimientos de ADN recombinante se realizaron usando los protocolos estándares. Se purificaron las estructuras de ADN usadas para la transfección desde *E. coli* de DH5 α usando el plásmido de Qiagen del equipo Mega según el protocolo

del fabricante. Todas las estructuras de ADN se verificaron por el secuencial de ADN, el cual se realizó por el Servicio de Secuencial, Escuela de Ciencias Naturales, Universidad de Dundee, Escocia, Reino Unido, usando DYEnamic ET terminador de química (Amersham Biosciences) en *Applied Biosystems automated ADN sequencers*. automatizados. El tampón de lisis contuvo 50 mM de Tris/HCl pH 7.5, 1 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 1% (p/v) de Tritón-X 100, 1 mM de ortovanadato de sodio, 50 mM de fluoruro de sodio, 5 mM de pirofosfato de sodio, 0.27 M de sacarosa, 0.1% (v/v) de 2-mercaptoetanol y el cocktail del inhibidor de proteínasa “completo” (una tableta/50 ml). el tampón A contuvo 50 mM de Tris/HCl pH 7.5, 0.1 mM de EGTA, y 0.1% (v/v) de 2-mercaptoetanol. El tampón de muestra SDS contuvo 50 mM de Tris/HCl pH 6.8, 2% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol, 0.005% (p/v) de bromofenol azul, y 1% (v/v) de 2-mercaptoetanol.

Estructuras de ADN. Se han descrito previamente las estructuras que expresan la longitud completa del LKB1 del tipo natural y del cinasa inerte del LKB1 del ratón (Sapkota *et al.*, 2002a; Sapkota *et al.*, 2002b; Sapkota *et al.*, 2001). Para generar el terminal-N del Myc apendizado del MO25 α cADN, un PCR se realizó con los cebadores: 5'-ggatccgc caccatggagcagaagctgatctgaagaggactgcccgttcccggttggaagctcacaaa t-3' y 5'-ggatccttaagcttcttgctgagctggctcttc-3' que usan un Consorcio del clon de IMAGEN EST (IMAGEN clon 4822388, NCBI Acc. BG719459) como una plantilla. El producto resultante PCR fue ligado dentro del vector intermedio de iniciación pCR2.1-TOPO (Invitrogen), y subclonado como un fragmento BamH1-BamH1 dentro de los vectores pEBG-2T (Sánchez *et al.*, 1994), pCMV5 (Anderson *et al.*, 1989) y pGEX-6T (Amersham). Para generar el terminal-N de Myc-apendizado del MO25 β cADN, un PCR se realizó con los cebadores

5'-caccggatccgccaccatggagcagaagctgatctctgaagaggacttgcccttggtagtaaatcacacaa aatcc-3' y 5'-ggatcctcaag-gggccggt ttctcaagtctcgg-3' que usan un clon del Consorcio de la IMAGEN EST (IMAGEN 1958217, NCBI Acc. AI252223) como una plantilla. El producto resultante PCR fue ligado dentro del vector intermedio de iniciación pENTR/D-TOPO (Invitrogen), y convertido en los vectores de Iniciación de la expresión de pEBG-2T, pCMV5 y pGEX-6T modificados. Debe notarse que el clon de la IMAGEN del MO25 β humano que nosotros obtuvimos pone en código para un Ala en lugar de un Val en la posición 153, comparada a la secuencia sometida, (NCBI asentimiento número Q9H9S4). El análisis secuencial de la secuencia del nucleótido de varias secuencias independientes de MO25 β listadas en la Tabla 1, indicó que todos éstos poseen un Ala en la posición 153. La expresión de las estructuras para Flag-apendizado STRAD α fueron PCR amplificado con los cebadores 5'-gatccgccaccatggactacaaggacgacgatgacaagtcattcttgaagtaaac-cagagcgaatc-3' y 5'-ggatcctcagaactccaatgctccactccagct-3 que usan un STRAD α cADN humano como una plantilla (Baas *et al.*, 2003). El producto PCR se ligó dentro del vector de pCR2.1-TOPO y fue subclonado como un fragmento de BamH1-Not1 dentro de pEBG-2T o como una inserción de BamH1-Xba1 dentro de pCMV5.

Para duplicar STRAD β , dos clones de IMAGEN EST (5301936 y 5501540), los cuales juntos abarcan la secuencia que codifica entera se usó como las plantillas para generar longitud completa Flag-apendizado del STRAD β cADN por PCR usando los cebadores 5'-ggatccgccaccatggactacaaggacgacgatgacaagtcatttggattgcttgcactcaag-3' y 5'-ggatccc tagaattcccagtgatgctttttcatc-3'. El producto PCR se ligó dentro del vector de pCR2.1-TOPO y fue subclonado como un fragmento BamH1-BamH1 dentro de los vectores pEBG-2T y pCMV5. El fragmento catalizador del LKB1 del ratón (residuos 44-343) que posee un terminal-N del apéndice del epítipo de Flag fue PCR amplificado desde el cADN de LKB1 de un ratón (Sapkota *et al.*, 2001) usando los cebadores: 5'-actagtgcaccatggactacaaggacgacgatgacaagaagctcatcggaagtacgtgatgggg-3' y 5'-actagttcagctctccaggtaggcactacagtcacat-3' y fue subclonado dentro del vector del pCMV5 como un fragmento de SpeI-SpeI. La codificación de la estructura para la expresión de GFP apendizada al LKB1 humano sin otro apéndice del epítipo fue descrita previamente (Boudeau *et al.*, 2003b). La mutagénesis dirigida al sitio se realizó empleando procedimientos estandarizados que usan el equipo de mutagénesis de Quickchange (Stratagene). Las mutaciones de la delección fueron generadas introduciendo los codones STOP en las posiciones indicadas.

Condiciones del cultivo celular y lisis celular. La generación de células de HeLa que expresan establemente el LKB 1 tipo natural o el cinasa inerte de LKB 1 se ha descrito previamente (Sapkota *et al.*, 2002b). Las células fueron cultivadas en el Minimum Essential Medium Eagle complementado con 10% (v/v) de tetraciclina-libre de FBS, en la presencia de 1 X solución del aminoácido no-esencial, 1 X solución de Penicilina/Estreptomycin (Invitrogen), 100 μ g/ml de zeocina y 5 μ g/ml de blasticidina (Invitrogen). El riñón humano embrionario (HEK) 293, las células fibroblasto embrionario de Rata-2, y las células de HeLa se mantuvieron en el medio Eagle modificado de Dulbecco complementado con 10% (v/v) de FBS. Para todos los experimentos, las células fueron cultivadas en un plato de 10-centímetros de diámetro y lisadas en 0.5 a 1 ml del Tampón de Lisis congelado. Los lisados fueron clarificados por centrifugación a 4°C durante 10 min. en 14.000 g.

Inmunotransferencia. Se sometieron las cantidades de proteínas indicadas en las leyendas de la figura a electroforesis SDS-gel de poliacrilamida y fueron transferidas a la nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1 hora en 50 mM de Tris/HCl (pH 7.5), 0.15 M de NaCl, 0.5% (v/v) de Tween que contiene 10% (p/v) de polvo de leche desnatada por 1 h. Las membranas se incubaron entonces en el mismo tampón que contiene 1 μ g/ml de anticuerpo (anticuerpos de LKB1, MO25 α y MO25 β) ó 0.1 μ g/ml (anticuerpo de STRAD α) por 8 h a 4°C. La inmunotransferencia con el anticuerpo T65-P se llevó a cabo como se describió anteriormente, excepto que el péptido no-fosforilado que corresponde al antígeno usado para cultivar el anticuerpo, se incluyó en una concentración de 10 μ g/ml. La inmunotransferencia con los anticuerpos GST, Flag, y Myc se llevó a cabo como anteriormente con 0.5 μ g/ml de anticuerpo excepto que el polvo de leche desnatada se reemplazó con 5% (w/v) de BSA. La detección se realizó usando los anticuerpos secundarios apropiados del peroxidasa-conjugado del rábano picante y el reactivo de quimioluminiscencia reforzado (Amersham Pharmacia Biotech).

Inmunoprecipitación de LKB1 endógeno y de MO25 α . Los anticuerpos de LKB1 y de MO25 α fueron covalentemente acoplados a la proteína G-Sefarosa en una proporción de 1 mg de anticuerpo a 1 ml de resina usando un procedimiento de enlace cruzado del pimelimidato de dimetilo (Harlow y Lane, 1988). Los lisados clarificados de 293 y Rata-2 células, generados como se describió anteriormente excepto que se omitió el 2-mercaptoetanol del tampón del lisis, conteniendo 2 mg de proteína de la célula total, se incubaron a 4°C por 1 h en una plataforma vibrante con 10 μ l de LKB1-proteína G-Sefarosa conjugada ó 15 μ l del MO25 α -proteína G-Sefarosa conjugada. Los inmunoprecipitados se lavaron dos veces con 1 ml del Tampón de Lisis (no conteniendo 2-mercaptoetanol) conteniendo 150 mM de NaCl y dos veces con 1 ml del Tampón A (no conteniendo 2-mercaptoetanol). Las cuentas fueron luego resuspendidas en un volumen de 20 μ l del Tampón A al cual se adicionó 5 μ l del tampón de muestra SDS carente de 2-mercaptoetanol. Las muestras se sometieron a electroforesis y después fueron inmunotransferidas para LKB 1, STRAD α y MO25 α como se describió anteriormente.

Expresión de proteínas de fusión-GST en 293 células y purificación por afinidad. Los platos de 10-centímetros de diámetro de 293 células fueron temporalmente transfectados con 3 a 10 μ g de las estructuras del pEBG-2T usando un método de fosfato de calcio modificado (Alessi *et al.*, 1996). 36 h post-transfección, las células fueron lisadas y los lisados clarificados se incubaron por 1 h en una plataforma giratoria con el glutatión-Sefarosa (25 μ l/plato de lisado) previamente equilibrado en el Tampón del lisis. Las cuentas se lavaron 4 veces con Tampón del lisis que contiene 150 mM de NaCl y dos veces con el Tampón A. Para el análisis de inmunotransferencia, las cuentas fueron entonces resuspendidas en el Tampón de prueba SDS después de este paso, para dar un último volumen de lodo de 75 μ l, y las muestras fueron inmunotransferidas según lo descrito anteriormente. Para los ensayos de la proteinocinasa y la electroforesis por gel, las cuentas fueron lavadas adicionalmente dos veces con el Tampón A conteniendo 0.27 M de sacarosa y las proteínas fueron eluidas desde la resina por incubación con el mismo tampón que contiene 20 mM de glutatión. Las cuentas fueron entonces removidas por filtración a través de un filtro de 0.44- μ m y el eluato dividido en alícuotas y guardado a -80°C.

Expresión y purificación de isoformas de GST-MO25 en E. coli. Las estructuras del pGEX-6T codificando el terminal-N GST apendizado de MO25 α ó GST apendizado de MO25 β se transformaron dentro de las células BL21 de E. coli. y un cultivo de 0.5-litro creció a 37°C en el caldo de Luria-Bertani hasta que la absorbancia a 600 nm fue ~0.7. Después, isopropil- β -D-tiogalactopiranosida se agregó a una concentración de 250 μ M para inducir la expresión de la proteína, y las células se cultivaron por unas 16 h adicionales a 26°C. Las células fueron recolectadas por centrifugación durante 30 min. en 5.000 g y resuspendidas en 25 ml del Tampón de Lisis. La lisis se completó por una ronda de congelado/derretido de diez ciclos de 15-seg. de sonicación. El lisado se centrifugó a 4°C por 30 min. en 20.000 g, los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de 0.44 μ m y se incubaron por 1 h en una plataforma giratoria con 1 ml de glutatión-Sefarosa equilibrado previamente en el Tampón de lisis. Las cuentas se lavaron 4 veces con el Tampón de lisis conteniendo 150 mM de NaCl, dos veces con el Tampón A y dos veces con el Tampón A conteniendo 0.27 M de sacarosa. Para eluir las isoformas de MO25 desde la resina, 15 μ g de proteasa de precorte del GST apendizado fue agregado el cual se pega al terminal-C del apéndice de GST en las proteínas de fusión-GST. La resina se incubó con el proteasa por 16 h a 4°C en una plataforma giratoria y las proteínas de MO25 se recolectaron por filtración a través de un filtro de 0.44- μ m. Las isoformas de MO25 eluidas fueron además incubadas con 0.25 ml de glutatión-Sefarosa por 30 min. a 4°C, para remover cualquier rastro de proteína de fusión-GST no cosechada y del proteasa de precorte de GST. 1 mg de MO25 homogéneo fue aislado típicamente, y después congelado en nitrógeno líquido y guardado en los alícuotas a -80°C.

Purificación de Flag-LKB1 y análisis por espectrometría de masa. Flag-LKB1 se inmuno purificó establemente de las células de HeLa expresando LKB1 tipo natural o el cinasa inerte de LKB1, o las células de HeLa de control que usan el gel de agarosa de M2-afinidad de anti-Flag según lo descrito previamente (Boudeau *et al.*, 2003a). Para cada purificación, se empleó un centenar de platos de 10 centímetros de diámetro de cada línea de la célula de HeLa y rindió 0.4 ml de la solución de LKB1 por afinidad del eluido purificado. 40 μ l de cada muestra (Fig. 1A senda 1-3) fueron sometidos a electroforesis en un gel premoldeado de poliacrilamida 4-12% SDS, y el gel teñido con azul coloidal y fotografiado. Para la muestra concentrada (Fig. 1A, senda 4), 250 μ l de la preparación de KD-LKB1 fue precipitado con metanol, resuspendido en 1X Tampón de Muestra SDS y analizado. Las bandas indicadas en la Figura 1A se cortaron, lavaron y digirieron con tripsina como se describió previamente (Woods *et al.*, 2001). Los péptidos tripticos fueron analizados por espectrometría de masa MALDI-TOF, usando el ácido α -cianocinnámico como la matriz, en un espectrómetro de masa STR Élite PerSeptive Biosystems. Los espectros fueron adquiridos en el modo de reflectron, internamente calibrados y las masas del péptido triptico se examinaron contra las bases de datos de NCBIInr y SwissProt que usan el programa del MS-FIT del Buscador de la Proteína (UCSF, CA) que se corre en un servidor local. La identidad de STRAD α y MO25 α también fue confirmada por el análisis de secuencia LC-MS/MS en un espectrómetro de masa Q-TOF2 como se describió previamente (Way *et al.*, 2002).

Purificación por afinidad del MO25 α con péptidos. Estreptavidina-Sefarosa equilibrada previamente en PBS se incubó con cada péptido biotinilado en una proporción de 1 μ g del péptido a 1 μ l de resina en una plataforma vibrante por 30 min., y las cuentas se lavaron entonces dos veces con PBS para remover cualquier péptido no conjugado. Los lisados celulares indicados (0,5 mg) se incubaron con el péptido de Estreptavidina-Sefarosa conjugado (5 μ l) por 1 h a 4°C en una plataforma vibrante. Las cuentas fueron lavadas dos veces con 1 ml de Tampón de Lisis que contiene 150 mM de NaCl y dos veces con 1 ml de Tampón A, y después resuspendidas en un volumen de 20 μ l de Tampón A al cual se agregó 5 μ l de tampón de muestra SDS. Las muestras se sometieron entonces a electroforesis y fueron inmunotransferidas para MO25 α según lo descrito anteriormente.

Análisis de Biacore. El enlace se analizó en un sistema BiaCore 3000 (BiaCore AB, Stevenage, Reino Unido). Los péptidos biotinilados indicados se ligaron a un circuito integrado Sensor recubierto de Estreptavidina (SA) (20 unidades de respuesta, RU). Varias concentraciones de MO25 α bacterianamente expresado previamente dializado en el tampón HBS-EP (10 mM de HEPES pH 7.4, 0.15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0.005% (v/v) de polisorbato-20, se inyectaron encima de los péptidos inmovilizados a una razón de flujo de 30 μ l/min. Las interacciones entre cada péptido y la proteína de MO25 α se analizaron sobre un rango de concentraciones de MO25 α de 6,25-3.200 nM y la ligazón del estado estacionario se determinó a cada concentración. La disociación de MO25 α desde cada péptido se supervisó durante un período de 1 min. La regeneración de la superficie del circuito integrado Sensor entre cada inyección se realizó con 3 inyecciones consecutivas de 5- μ l de 10 mM de NaOH, 1 M de NaCl.

Autofosforilación de LKB1 y fosforilación de MBP. 0,5 μ g de GSTLKB1 tipo natural o catalíticamente inactivo de los complejos indicados de LKB1 (Figura 8) que había sido purificado por afinidad en glutatión-Sefarosa desde 293 células, se incubó en una mezcla de 30- μ l de la reacción que contiene 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% de 2-mercaptoetanol, 0.1 mM de EGTA, 10 mM de cloruro de manganeso, 0,5 μ M de microcistina-LR, y 100 μ M de [γ -32P]ATP (1.000 cpm/pmol) en la presencia de 3,3 μ g de MBP bovino. Después de la incubación por 40 min. a 30°C, las reacciones se terminaron por la adición de 8 μ l del Tampón de muestra. 30 μ l fue sometido a electroforesis en los geles de SDS-poliacrilamida, los cuales fueron entonces secados y analizados por auto-radiografía para cuantificar la autofosforilación de LKB 1, MBP y la fosforilación de STRAD α . 5 μ l de cada reacción fue diluido en 45 μ l de 1 X Tampón de Muestra SDS. De la solución resultante, se usaron 10 μ l para la inmunotransferencia con los anticuerpos anti -GST (reconoce LKB1), anti-Flag (reconoce STRAD α y STRAD β) y anti myc (reconoce MO25 α y MO25 β). 30 μ l de la muestra se usó para la inmunotransferencia con el anticuerpo de MBP T65-P.

Estudios de localización. Se cultivaron las células de HeLa a 50% de confluencia en los refugios de vidrio (no. 1.5) en los platos de 10 centímetros de diámetro y fueron transfectadas con un total de 2 μ g de una estructura poniendo en código al GFP-LKB1 tipo natural junto con las estructuras indicadas del pCMV5 usando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen) según el protocolo del fabricante. Un duplicado del conjunto de platos se usó para cada condición. Las células se lavaron con PBS 20 h post-transfección, y se fijaron por 10 min. en paraformaldehído frescamente preparado al 4% (v/v) en el Tampón PHEM (60 mM de Pipes, 25 mM de Hepes, 10 mM de EGTA y 2 mM de sulfato de magnesio, pH 7.0). Las células se lavaron entonces dos veces con PBS y permeabilizadas con 1% (por Vol.) de NP40 en PBS y bloqueadas con 10% del suero de la cabra normal. Las células fueron inmuno rotuladas con ambos anticuerpos el anticuerpo anti-MO25 α y el anticuerpo anti-Flag (para detectar STRAD α Flag-apendizado), lavado en PBS y contador de manchados con la Red de Texas de los anticuerpos de anti-oveja IgG y anti-ratón de IgG Cy5. Las células fueron representadas en imagen usando un microscopio Zeiss LSM 510 META confocal. Cada canal fue examinado independientemente para evitar la charla cruzada (Multirastro).

Análisis de transferencia Northern. Un cADN que corresponde a MO25 α humano (NCBI Acc, N. NM_016289, residuos del nucleótido, 1.550 a 2.500), fue marcado con 32P al azar imprimando usando un equipo que marca el ADN Hi Prime (Roche). Esta sonda se usó para proteger la transferencia Northern de un Tejido Múltiple (Clontech, PT1200-1) usando el Tampón Rapid-Hyb (Amersham Pharmacia) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante. Siguiendo a la auto-radiografía, la sonda fue despojada y la transferencia fue entonces re-hibridizada como anteriormente con una sonda de β -actino proporcionada por el fabricante.

Referencias

Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., HemMings, B.A. y Cohen, P. (1996) Base Molecular para el sustrato la especificidad de la proteinocinasa B; la comparación con el cinasa-1 de MAPKAP y el cinasa p70 S6. *FEBS Lett*, 399, 333-338.

Anderson, S., Davie, D.N., Dahlbäck, H., Jörnvall, H. y Russell, D.W. (1989) Clonación, estructura, y expresión del mitocondrial cito crome-P-450 esterol 26-hidroxilasa, una enzima biosintética bilis-ácido D. *J. Biol. Chem.*, 264, 8222-8229.

Harlow, E. y Lane, D. (1988) Anticuerpos un Manual de Laboratorio. Cold Spring Harbor Laboratory Publications, Nueva York.

Lizcano, J.M., Deak, M., Morrice, N. y Alessi, D.R. (2002). Identificación de los residuos de S6K, SGK y PKB que son fosforilados por NEK6. Manuscrito en Preparación.

Sánchez, I., Hughes, R.T., Mayer, B.J., Yee, K., Woodgett, J.R., Avruch, J., Kyriakis, J.M. y Zon, L.I. (1994) Papel de cinasa-1 de SAPK/ERK en la senda tensión-activada que regula el factor de transcripción c-jun. *Naturaleza*, 372, 794-798.

Way, G., Morrice, N., Smythe, C. y O'Sullivan, A.J. (2002) Purificación e identificación de secernina, una nueva proteína citosólica que regula la exocitosis en los mastocitos. *Mol Biol Cell*, 13, 3344-3354.

Woods, Y.L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T.G. y Cohen, P. (2001) El cinasa de DYRK1A fosforila el factor de la transcripción FKHR a Ser329 *in vitro*, un nuevo sitio de fosforilación *in vivo*. *Biochem J*, 355, 597-607.

- Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R. y Clevers, H.C.** (2003). Activación del cinasa de LKB1 supresor de tumor por el STE20-como Pseudocinasa STRAD. *EMBO J* 22 (12), 3062-3072
- 5 **Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R. y DePinho, R.A.** (2002) La pérdida del Lkb1 supresor del tumor provoca poliposis intestinal pero resistencia a la transformación. *Naturaleza*, 419, 162-167.
- 10 **Bidlingmaier, S., Weiss, E.L., Seidel, C., Drubin, D.G. y Snyder, M.** (2001) La senda de Cbklp es importante para el crecimiento celular polarizado y la separación de la célula en el *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 21, 2449-2462.
- Boudeau, J., Deak, M., Lawlor, M.A., Morrice, N.A. y Alessi, D.R.** (2003a) La proteína 90 calor-choque y Cdc37 actúan recíprocamente con LKB1 y regulan su estabilidad. *Biochem J*, 370, 849-857.
- 15 **Boudeau, J., Kieloch, A., Alessi, D.R., Stella, A., Guanti, G. y Resta, N.** (2003b) Análisis funcional de los mutantes de LKB1/STK11 y dos isoformas aberrantes encontradas en los pacientes del Síndrome de Peutz-Jeghers. *Hum Mutat*, 21, 172.
- 20 **Buchet-Poyau, K., Mehenni, H., Radhakrishna, U. y Antonarakis, S.E.** (2002) Búsqueda para el segundo sitio del síndrome de Peutz-Jeghers: exclusión de los genes STK13, PRKCG, KLK10, y PSCD2 en el cromosoma 19 y el gen STK11IP en el cromosoma 2. *Cytogenet Genome Res*, 97, 171-178.
- 25 **Collins, S.P., Reoma, J.L., GamM, D.M. y Uhler, M.D.** (2000) LKB1, Un nuevo cinasa de la proteína de serina/treonina y el supresor del tumor potencial, es fosforilado por el cinasa de la proteína cAMP-dependiente (PKA) y prenilado *in vivo*. *Biochem J*, 345 Pt 3, 673-680.
- Dorland, S., Deegenaars, M.L. y Stillman, D.J.** (2000) Papeles para el *Saccharomyces cerevisiae* de los genes de SDS3, CBK1 y HYM1 en la represión del transcripcional por SIN3. *Genetics*, 154, 573-586.
- 30 **HemMinki, A.** (1999) La base molecular y los aspectos clínicos del síndrome de Peutz-Jeghers. *Cell Mol Life Sci*, 55, 735-750.
- 35 **HemMinki, A., Markie, D., Tomlinson, yo., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P., Jarvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpaa, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olschwang, S., Olsen, A.S., Stratton, M.R., de la Chapelle, A. y Aaltonen, L.A.** (1998) Un gen del cinasa de serina/treonina defectivo en el síndrome de Peutz-Jeghers. *Naturaleza*, 391, 184-187.
- 40 **Jenne, D.E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Muller, O., Back, W. y ZimMer, M.** (1998) El síndrome de Peutz-Jeghers es causado por mutaciones en un nuevo cinasa de serina treonina. *Nat Genet*, 18, 38-43.
- 45 **Jishage, K.I., Nezu, J.I., Kawase, Y., Iwata, T., Watanabe, M., Miyoshi, A., Ose, A., Habu, K., Kake, T., Kamada, N., Ueda, O., Kinoshita, M., Jenne, D.E., Shimane, M. y Suzuki, H.** (2002) Papel de Lkb1, el gen causativo del síndrome de Peutz-Jegher, en la embriogénesis y poliposis. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 99, 8903-8908.
- Johnston, A.M., Naselli, G., Gonez, L.J., Martin, R.M., Harrison, L.C. y DeAizpurua, H.J.** (2000) SPAK, un cinasa STE20/SPS1-relacionado que activa la senda del p38. *Oncogene*, 19, 4290-4297.
- 50 **Jorgensen, P., Nelson, B., Robinson, M.D., Chen, Y., Andrews, B., Tyers, M. y Boone, C.** (2002). Mapeo Genético de Alta-Resolución con las Series Ordenadas de los Mutantes de la Delección del *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 162, 1091-1099.
- 55 **Karos, M. y Fischer, R.** (1999). Caracterización Molecular de HymA, una proteína evolutivamente favorablemente conservada y favorablemente expresada del *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 260, 510-521.
- Karuman, P., Gozani, O., Odze, R.D., Zhou, X.C., Zhu, H., Shaw, R., Brien, T.P., Bozzuto, C.D., Ooi, D., Cantley, L.C. y Yuan, J.** (2001) El gen del Peutz-Jegher producto de LKB 1 es un mediador de la muerte de la célula p53-dependiente. *Mol Cell*, 7, 1307-1319.
- 60 **Marignani, P.A., Kanai, F. y Carpintero, C.L.** (2001). Lkb1 asocia con el brgl y es necesario para la detención del crecimiento de brgl-inducido. *El J Biol Chem*, 276, 32415-32418.
- 65 **Martin, S.G. y St Johnston, D.** (2003) Un papel para Drosophilal LKB1 en la formación del eje anterior-posterior y la polaridad epitelial. *Naturaleza*, 421, 379-384.
- Miyamoto, H., Matsushiro, A. y Nozaki, M.** (1993) Clonación Molecular de una nueva secuencia del mRNA expresada en la fase de segmentación del embrión del ratón. *Mol Reprod Dev*, 34,1-7.

Miyoshi, H., Nakau, M., Ishikawa, T.O., Seldin, M.F., Oshima, M. y Taketo, M.M. (2002). Poliposis Hamartomatosa Gastrointestinal en el Lkb1 del knockout de ratones heterocigotos. *Cancer Res*, 62, 2261-2266.

Nakau, M., Miyoshi, H., Seldin, M.F., Imamura, M., Oshima, M. y Taketo, M.M. (2002). Carcinoma Hepatocelular causado por la pérdida de la heterocigosidad en el gen de Lkb 1 del knockout de ratones. *Cancer Res*, 62, 4549-4553.

Nishigaki, K., Thompson, D., Yugawa, T., Rulli, K., Hanson, C., Cmarik, J., Gutkind, J.S., Teramoto, H. y Ruscelli, S. (2003). Identificación y caracterización de un nuevo cinasa Ste-20/GCK-relacionados, cinasa de PAP (PAPK). *J Biol Chem*.

Nozaki, M., Onishi, Y., Togashi, S. y Miyamoto, H. (1996). Caracterización Molecular del gen de Drosophila Mo25 que se conserva entre Drosophila, ratón, y levadura. *ADN Cell Biol*, 15, 505-509.

Resta, N., Stella, A., Susca, F.C., Di Giacomo, M., Forleo, G., Miccolis, yo., Rossini, F.P., Genuardi, M., Piepoli, A., Grammatico, P. y Guanti, G. (2002). Dos nuevas mutaciones y una nueva isoforma del gen de STK11/LKB1 en pacientes de Peutz-Jeghers. *Hum Mutat*, 20, 78-79.

Rossi, D.J., Ylikorkala, A., Korsisaari, N., Salovaara, R., Luukko, K., Launonen, V., Henkemeyer, M., Ristimäki, A., Aaltonen, L.A. y Makela, T.P. (2002). Inducción de ciclooxigenasa-2 en un ratón modelo de la poliposis de Peutz-Jeghers. *Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos*, 99, 12327-12332.

Sanna, M.G., da Silva Correia, J., Luo, Y., Chuang, B., Paulson, L.M., Nguyen, B., Deveraux, Q.L. y Ulevitch, R.J. (2002). ILIP, una nueva proteína del anti-apoptótico que refuerza la activación XIAP-mediada de JNK1 y la protección contra el apoptosis. *J Biol. Chem*, 277, 30454-30462.

Sapkota, G.P., Boudeau, J., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N. y Alessi, D.R. (2002a). Identificación y caracterización de cuatro nuevos sitios de fosforilación (Ser31, Ser325, Tr336 y Tr366) en LKB1/STK11, la proteinocinasa mutada en el síndrome de cáncer de Peutz-Jeghers. *Biochem J*, 362, 481-490.

Sapkota, G.P., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., Goodarzi, A.A., Smythe, C., Shiloh, Y., Lees-Miller, S.P. and Alessi, D.R. (2002b) Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK1 at Thr-366. *Biochem J*, 368, 507-516.

Sapkota, G.P., Kieloch, A., Lizcano, J.M., Lain, S., Arthur, J.S., Williams, M.R., Morrice, N., Deak, M. and Alessi, D.R. (2001) Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers Cancer Syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90RSK and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys433, is essential for LKB1 to suppress cell growth. *J Biol Chem*, 276, 19469-19482.

Smith, C.M., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, Akamine, P. and Taylor, S.S. (1999) The catalytic subunit of cAMPdependent protein kinase: prototype for an extended network of communication. *Prog. Biophys Mol. Biol.*, 71, 313-341.

Smith, D.P., Rayter, S.I., Niederlander, C., Spicer, J., Jones, C.M. and Ashworth, A. (2001) LIP1, a cytoplasmic protein functionally linked to the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 2869-2877.

Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M. and Cantley, L.C. (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*, 275, 73-77.

Tamari, M., Daigo, Y. and Nakamura, Y. (1999) Isolation and characterization of a novel serine threonine kinase gene on chromosome 3p22-21.3. *J. Hum. Genet.*, 44, 116-120.

Tiainen, M., Vaahtomeri, K., Ylikorkala, A. and Makela, T.P. (2002) Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Hum Mol Genet*, 11, 1497-1504.

Tiainen, M., Ylikorkala, A. and Makela, T.P. (1999) Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 9248-9251.

Watts, J.L., Morton, D.G., Bestman, J. and Kemphues, K.J. (2000) The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development*, 127, 1467-1475.

Ylikorkala, A., Rossi, D.J., Korsisaari, N., Luukko, K., Alitalo, K., Henkemeyer, M. and Makela, T.P. (2001) Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice. *Science*, 293, 1323-1326.

Yoo, L.I., Chung, D.C. and Yuan, J. (2002) LKB1 A master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nat Rev Cancer*, 2, 529-535.

Ejemplo 2

Complejos entre el supresor del tumor LKB1, Strada/β Mo25α/β que son cinasas ascendentes en la cascada de cinasa-proteína AMP activada

La cascada de proteína cinasa de AMP activada (AMPK) es un sensor de la carga de energía celular que actúa como un “encendedor primario metabólico” e impide la proliferación celular. La activación requiere de la fosforilación dentro del lazo de activación (Thr-172) por las cinasas ascendentes (AMPKKs) que no han sido identificadas. Recientemente identificamos tres proteínas cinasas relacionadas que actúan ascendente del homólogo de levadura de AMPK, los que no tienen homólogos obvios de mamíferos. Sin embargo, la cinasa de mamífero estrechamente relacionada es LKB1, para la cual ha sido identificado un sustrato no fisiológico. LKB1 actúa como un supresor de tumores y esta mutado en el síndrome de Peutz-Jeghers humano. Mostramos en el Ejemplo 1 que existe como un complejo con dos subunidades no esenciales, STRADα/β y MO25 α/β.

Hemos reportado que: (i) dos actividades de AMPKK purificados de hígado de rata contienen LKB1, STRADα y MO25α, y pueden ser inmunoprecipitadas usando anticuerpos anti-LKB1; (ii) ambos complejos recombinantes y endógenos de LKB1 STRADα y MO25α activan AMPK vía la fosforilación de Thr-172, (iii) LKB1 activo catalíticamente y STRADα ó STRADβ y MO25α ó MO25β son requeridos para la actividad total; (IV) los medicamentos AICA ribosida y fenformina no activan AMPK en células HeLa (ya que carecen de LKB1), pero estas pueden ser restituidas expresando LKB1 en estas células de tipo salvaje, pero no catalíticamente inactiva.

Estos resultados proporcionan la primera descripción de un sustrato fisiológico para el represor del tumor LKB1 y sugieren que funciona como un regulador ascendente de AMPK. Nuestras conclusiones indican que la formación de tumores en el síndrome de Peutz-Jeghers podría resultar de la activación deficiente de AMPK como consecuencia de la inactivación de LKB 1.

Resultados

Resolución de dos AMPKKs de extractos de hígado de rata

Mientras experimentábamos con diferentes condiciones para optimizar la recuperación del paso de *Q-Sepharose* de nuestro protocolo de purificación de AMPKK [14], encontramos que podíamos resolver dos picos de actividad máxima (figura 13A). Debido a que el segundo pico parece corresponderse con AMPKK purificado originalmente [14], referimos este como AMPKK1, con el primer pico eluido de la columna denominada como AMPKK2 en la figura 13A, el ensayo AMPKK es dirigido usando como sustrato glutatión-S-transferasa (GST) expresado de una fusión bacteriana del dominio catalítico de AMPKα1 de rata. Esto es más conveniente que el heterotrimer de AMPK usado antes de hígado de rata nativa [14] ya que el dominio catalítico de AMPKα1 esta completamente desfosforilado y por lo tanto inactivo cuando se expresa en bacterias. Es también posible llevar a cabo el ensayo con el sustrato unido a las perlas de glutatión-*Seapharose*, permitiendo que cualquier AMPK endógeno en la fracción de AMPKK pueda interferir al ser lavado. En la cromatografía de exclusión por tamaño *Sephacryl S-200*, AMPKK1 y AMPKK2 son eluidos como proteínas grandes pero de tamaños distintos. En comparación con los patrones, los radios de Stokes para AMPKK1 y AMPKK2 fueron calculados como 5,2 y 5,7 nm respectivamente. El Ca²⁺ y la calmodulina no estimularon ni AMPKK1 ni AMPKK2, y son inmunoprecipitados que usan un anticuerpo contra CaMKK (no mostrado).

Ambos AMPKK1 y AMPKK2 contienen LKB1, STRADα y MO25α

Al examinar si cualquiera de estas dos fracciones podrían contener LKB1, se monitorean las manchas de las fracciones que atraviesan la cromatografía *Q-Sepharose* usando anticuerpos contra LKB1, STRADα y MO25α (Figura 13B-D). Esto revela que la actividad de AMPKK2 tiene una correlación con la presencia del polipéptido LKB1 de ~ 50 kDa (~ 50 kDa) tanto como STRADα (~ 45/48 kDa) y MO25α (~40 kDa) en 18-22 fracciones. STRADα es detectado como un doblete como se reportó anteriormente [30]; la razón para este comportamiento no se conoce. No obtuvimos ninguna señal de masa molecular correcta en estas fracciones que usaban el anticuerpo anti-MO25β (no mostrado), esto es compatible con nuestras observaciones, la isoforma MO25β no esta expresada en hígado de ratón (ejemplo 1). También obtuvimos una señal leve para LKB1 y STRADα en las fracciones 27-29 que contenían AMPKK1, pero al estas cargarse con MO25α estuvieron por debajo del límite de detección en estas fracciones. Sin embargo, la presencia de LKB1, STRADα y MO25α en AMPKK1 se confirma analizando las cargas más alta de las fracciones 26-30 (Figura. 12E-G). Una conclusión interesante es que el polipéptido LKB1 migra con una movilidad ligeramente más rápida en AMPKK1 comparado con AMPKK2: esto es evidente por la inspección de la Figura 13B (ver también figuras. 14B y 14D).

Actividad de AMPKK puede ser inmunoprecipitada de AMPKK1 y AMPKK2

Usando el anticuerpo anti-LKB1 pero no un control preinmune de IgG somos capaces de inmunoprecipitar la actividad de AMPKK tanto para AMPKK1 como en AMPKK2. La Figura 14A muestra los resultados de un experimento, donde la cantidad de cinasa estuvo limitada y el anticuerpo estaba en exceso y se muestra que somos capaces de remover más del 80% de la actividad de las fracciones del pico que contiene AMPKK1 y AMPKK2, por inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-LKB1 mientras que ninguna actividad fue eliminada usando el control pre-inmune de inmunoglobulina. Podríamos retirar mas del 95% de la actividad de AMPKK de un complejos GST-marcado LKB1-

STRAD α -MO25 α recombinante (ver próxima sección) bajo las mismas condiciones. La pequeña cantidad de actividad remanente en los sobrenadantes de AMPKK1 y las fracciones de AMPKK2 podrían ser explicadas por el hecho de que la inmunoprecipitación no fue cuantitativa en estos casos, con aproximadamente un 20% del polipéptido LKB1 que se queda en el sobrenadante (figura 14B).

Debido a la pequeña cantidad de AMPKK1 y AMPKK2 que es usado en este experimento, es difícil probar al analizar los precipitados la actividad de AMPKK por la presencia de otros polipéptidos. Aunque se repite el experimento con más cinasa y menos anticuerpo (la cantidad de anticuerpo es ahora restrictiva) y se analizan los precipitados solamente. Esto demuestra que podíamos recuperar casi toda la actividad de AMPKK en el precipitado de las fracciones del pico que contenían AMPKK1 y AMPKK2 como desde el complejo LKB1-STRAD α -MO25 α recombinante, y ninguna actividad recuperada cuando usamos el control preinmunizado de inmunoglobulina (Figura 14C). *Western blotting* de los precipitados de AMPKK1 y AMPKK2 muestran que contenían LKB1, STRAD α y MO25 α , aunque el STRAD α del doblete es muy leve en el precipitado de AMPKK1 (Figura 14D).

Complejos LKB1-STRAD α -MO25 α recombinante activa el dominio catalítico de AMPK α 1 en ensayos de células libres

Para examinar si LKB1 activa AMPK sobre sí mismo o si las subunidades suplementarias STRAD α/β y MO25 α/β son requeridas, nosotros expresamos GST-LKB1-marcado, FLAG-STRAD α/β marcado y *myc*-MO25 α/β marcado en varias combinaciones en células HEK-293T, y se purificaron los complejos sobre glutatión-Sepharose. También usamos como una mutante de LKB1 inactiva una cinasa marcada por GST (D194A), y un plásmido que expresa sólo GST, como control. Los complejos purificados fueron incubados con el dominio catalítico de AMPK α 1 en presencia de MgATP, y se mide la activación del dominio catalítico tanto como la fosforilación de Thr-172 (usando anticuerpo de fosforo-específico anti-pT172). La Figura 15A muestra que solo LKB1 no incrementó la actividad significativamente, o la fosforilación de Thr172 del dominio catalítico de AMPK α 1 de arriba y se observa solamente la actividad base en presencia de GST (comparación carril 1 y 14). El mismo resultado fue obtenido con LKB1 que ha sido expresado con MO25 α ó MO25 β (carriles 4 y 5), lo cual se esperaba ya que estas proteínas no interactúan con LKB1 en ausencia de STRAD α/β (ejemplo 1). Un complejo LKB1-STRAD α da una pequeña pero importante activación y fosforilación del dominio catalítico AMPK α 1 Thr172 por encima del valor base (comparación carriles 1 y 2). Sin embargo, para producir una activación y fosforilación del dominio catalítico de AMPK α 1 grande, se requiere un complejo heterotrimerico que contiene LKB1, STRAD α ó STRAD β , y MO25 α o MO25 β (carriles 6 a 9). El orden del grado de activación de los complejos heterotrimerico es LKB1-STRAD α -MO25 α > LKB1-STRAD α -MO25 β ~ LKB1-STRAD β -MO25 α > LKB1-STRAD β -MO25 β . Importante, es la capacidad de los complejos LKB1-STRAD-MO25 para activar AMPK α 1 completamente que es dependiente de la actividad catalítica de LKB1, porque los complejos de una mutante inactiva catalíticamente de LKB1 D194A con varias combinaciones de STRAD α/β y MO25 α/β (carriles 10-13), son capaces de activar AMPK α 1 fosforilado. El grado de activación obtenido con estos distintos complejos de LKB1 de tipo salvaje correlaciona bien con la fosforilación de Thr-172. Probando con un anticuerpo contra el dominio catalítico de AMPK α 1 entero (GST marcado AMPK α 1 en Figura 15A) se confirma que la carga fue uniforme en estas muestras. Los fondos de los tres carriles en la Figura 15A confirman que las subunidades relevantes de STRAD y MO25 coprecipitadas con LKB1 cuando habían sido transfectados los ADN's que codifican para estas subunidades. Cuando STRAD α fue expresada con LKB1 en ausencia de una subunidad de MO25, la cantidad de la subunidad STRAD α que coprecipita con LKB1 se reduce (carriles 2 y 3). Esto es compatible con las conclusiones previas de que la presencia de una subunidad de MO25 estabiliza los complejos LKB1-STRAD (Ejemplo 1).

En la Figura 15B se proporcionan las pruebas que evidencian que Thr-172 fue el único sitio sobre el dominio catalítico de AMPK α 1 fosforilado por el complejo LKB1-STRAD α -MO25 α . Cuando las dos proteínas fueron incubadas juntas en presencia de [γ ³²P] ATP, el dominio catalítico de AMPK α 1 de tipo salvaje se favorece en ³²P marcado, pero no lo hace una mutante Thr172 → Ala del dominio catalítico de AMPK α 1.

Complejos AMPKK1, AMPKK2 y LKB1-STRAD-MO25 recombinante también activan los complejos de AMPK heterotrimerico

Aunque la mayor parte de los ensayos de AMPKK del estudio fueron dirigidos usando el dominio catalítico AMPK α 1 como sustrato, la Figura 16 muestra que AMPKK1, AMPKK2 y el complejo GST-LKB1:STRAD α :MO25 α recombinante activa los complejos de AMPK heterotrimerico. Los plásmidos que codifican para las subunidades de AMPK α_1, β_1 y γ_1 ó α_2, β_1 y γ_1 fueron expresadas en células CCL13 y purificados por medio de un *myc tag* sobre las subunidades α . Los complejos AMPK recombinante ligados a las perlas G-Sepharose y proteína fueron incubadas con MgATP y AMPKK1, AMPKK2 o GST-LKB1:STRAD α :MO25 α , las cinasas ascendentes son lavadas y se determina la actividad de los complejos de AMPK. La Figura 16 muestra que ambos complejos $\alpha_1\beta_1\gamma$ y $2\beta_1\gamma_1$ fueron activados todos por las tres preparaciones de cinasa ascendente, y esta correlaciona con la fosforilación de Thr-172 sobre las subunidades α , esto demuestra el uso del anticuerpo anti-pT172 (el que reconoce Thr-172 fosforilada tanto sobre α_1 y α_2). El manchón usando los anticuerpos anti- α_1 y α_2 confirma la carga uniforme (indica que la señal más fuerte es obtenida siempre con el anti- α_2 que con el anticuerpo anti- α_1 , aún cuando la carga de proteína es la misma). Aunque la actividad de AMPKK2 usada es 3,5 veces mayor que AMPKK1 y solamente el 30% más bajo que GST-LKB1-STRAD α -MO25 α en relación con su capacidad de activar el dominio catalítico de AMPK α 1, AMPKK2 parecía ser mucho menos efectiva para activar el complejo $\alpha_1\beta_1\gamma$. Estas diferencias son menos obvias usando el complejo $\alpha_2\beta_1\gamma$ como sustrato.

LKB1 endogeno que activa AMPK puede ser inmunoprecipitada de células 293 pero no de células HeLa

La Figura 17 muestra que una actividad del dominio catalítico de AMPK α 1 activado y la Thr-172 fosforilada podría ser inmunoprecipitada desde extractos de células HEK 293T no transfectada usando los anticuerpo anti-LKB1 (carril 1), pero no un control preinmune de inmunoglobulina (carril 2). Como esta previamente reportado [30, Ejemplo 1], la inmunoprecipitación de LKB1 endogena resulta en la precipitación de STRAD α y MO25 α (carril 1). Como un control adicional, empleamos células HeLa normales ya que se conoce que LKB1 no esta expresado en estas células [23]. Consistente con esto, subunidades no LKB1-STRAD α -MO25 α o con actividad AMPKK fueron inmunoprecipitadas desde la misma cantidad de extracto de proteína de célula HeLa usando un anticuerpo anti-LKB1 (carril 3). Sin embargo, la actividad de AMPKK y la fosforilación de Thr-172, tanto en las subunidades STRAD α y MO25 α son detectables, y son recuperadas luego de la inmunoprecipitación de LKB1 desde células HeLa [34], que estabilizan la expresión de LKB1 de tipo salvaje [32] (carril 5). En las células que expresan una mutante catalíticamente inactiva de LKB1, los polipéptidos STRAD α y MO25 α son recuperados por inmunoprecipitación usando el anticuerpo anti-LKB1, pero no actividad AMPKK (carril 7). Aunque el polipéptido LKB1 fue sobre expresado en gran parte en las células HeLa comparado con los niveles endogenos observados en las células 293 (Figura 14, carriles de comparación 1 y 5), es claro que la cantidad de STRAD α y MO25 α en las células es limitado en estas células. Existe una baja cantidad de actividad AMPKK y fosforilación de Thr-172, así como STRAD α y MO25 α precipitado, en células HeLa expresando LKB1 que en células 293, aunque el mismo LKB1 estaba sobre expresado. La actividad de AMPKK en los inmunoprecipitados de células 293 y células HeLa expresa LKB1 de tipo salvaje que tiene correlación con los niveles de STRAD α y MO25 α en el complejo en vez de los niveles de LKB1. Esto enfatiza además la naturaleza esencial de las subunidades STRAD y MO25 en aumentar la actividad de AMPKK de LKB1.

Expresión de LKB1 restituye la activación de AMPK en células HeLa

Previamente hemos encontrado (resultados no publicados), que aunque AMPK se expresa en células HeLa, no es activado por el medicamento ribosida de 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICA) y metformina, que activan la cinasa fácilmente en otros tipos de célula [33, 34]. Como en células HeLa no se expresa LKB1 [23] esto podría proporcionar una explicación potencial para esta anomalía. Para examinar si la expresión de LKB1 recombinante podría restituir la capacidad de células HeLa de responder a estos medicamentos, se han usado células HeLa que expresan establemente LKB1 de tipo salvaje, o la mutante inactiva catalíticamente [32], tanto como el control en línea de células HeLa que no expresan LKB1. En estos experimentos usamos fenformina, que hemos encontrado que activa AMPK más rápidamente y que es más potente que la metformina en otros tipos de célula. La Figura 18A muestra que ni AICA ribosida, ni fenformina, activa AMPK en células HeLa control. Sin embargo, en células que expresan LKB1 de tipo salvaje, pero no en la mutante inactiva de cinasa, ambas AICA ribosida como fenformina causan una activación fuerte de AMPK. Esto tiene correlación con la fosforilación de Thr-172 sobre AMPK α , indicado por el monitoreo con el anticuerpo anti-pT172 (figura 18B), y también con la fosforilación descendente de AMPK, acetil-CoA carboxilasa (ACC), indicado por el monitoreo con un anticuerpo fosforo-específico contra Ser-79, en el sitio principal sobre esa proteína AMPK (anti-pACC, Figura 18C). Curiosamente la expresión estable de LKB1 tipo salvaje en las células HeLa causó un título pequeño pero reproducible regulando la expresión de AMPK y haciendo la regulación hacia abajo de la expresión de ACC (no indicada). Debido a que la expresión de estas proteínas no es uniforme en estas células, para cuantificar el estado de fosforilación con exactitud simultáneamente se monitorean las manchas de los lisados usando anticuerpos anti-pT172 y anti- α_1/α_2 (detecta la fosforilación de Thr-172 y de AMPK α total), o con anti-pACC y avidina (detecta la fosforilación de Ser-79 y ACC total). Los dos reactivos de monitoreo usados en cada uno de éstos protocolos de doble marcaje fueron identificados con diferentes tinturas fluorescentes que emiten en diferentes regiones del espectro infrarrojo (IR), y los resultados son cuantificados en dos canales distintos usando un escáner de rayo láser de IR. En la Figura 18B y 18C los resultados son expresados como proporciones de la señal obtenida que usa el anticuerpo fosforo-específico para la proteína total. Este método es correcto para diferentes niveles de expresión de proteínas, y revela que hay una buena correlación entre la activación de AMPK y la fosforilación de Thr-172. También había una correlación con la fosforilación de ACC, aunque en este caso AICA ribosida parecía tener un efecto mayor que la fenformina.

Discusión

Nuestros resultados proporcionan pruebas fehacientes de que los complejos LKB1-STRAD-MO25 representan las principales actividades de cinasa ascendente sobre AMPK. Las pruebas principales se resumen de la siguiente manera:

1. Durante los extensos esfuerzos anteriores de unos 10 años para purificar los extractos de hígado de rata que activan AMPK defosforilado, no se han detectado algunas actividades aparte de AMPKK1 y AMPKK2, por lo menos bajo las condiciones usadas de los ensayos ([14] y el trabajo no publicado siguiente).
2. Tanto AMPKK1 como AMPKK2 contenían LKB1, STRAD α y MO25 α que son detectable por *Western blot* y tienen correlación con la actividad (Figura 13).
3. Crucialmente, la capacidad de las fracciones de AMPKK1 y AMPKK2 de activar el dominio catalítico de AMPK es casi eliminada totalmente por inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-LKB1 pero no por una inmunoglobulina control. La actividad es detectada en los inmunoprecipitados anti-LKB1, junto con los polipéptidos LKB1, STRAD α y MO25 α , pero no en los inmunoprecipitados control (Figura 14).

4. La actividad de AMPKK en AMPKK1 y en AMPKK2 no fue un contaminante que precipitó con el anticuerpo anti-LKB1, porque los complejos recombinantes de GST-LKB1, STRAD y MO25 se expresan en células 293 y se purifican en glutatión-*Sepharose* activado en el dominio catalítico de AMPK α 1 y Thr -172 fosforilada eficientemente, (Figura 15). Esta actividad estaba en función de la integridad del dominio catalítico de LKB 1, porque los complejos se formaron de LKB1 inactivo catalíticamente con una subunidad STRAD y MO25 que se deja de activar ó en AMPK fosforilado. La fosforilación del dominio catalítico parecía ocurrir exclusivamente en Thr 172, porque el dominio catalítico de AMPK tipo salvaje, excepto en una mutante T172A, podía ser fosforilado usando [^{32} P] ATP y el complejo GST-LKB1-STRAD α -MO25 α .
5. Aunque la mayoría de los experimentos en este trabajo fueron dirigidos usando el dominio catalítico de AMPK α 1 expresado como sustrato bacteriano, AMPKK1, AMPKK2 y complejo recombinante LKB1-STRAD α -MO25 α también se activan los complejos AMPK α 1 heterotrimerico ($\alpha_1\beta_1\gamma$ y $\alpha_2\beta_1\gamma_1$) eficientemente, y fosforilado luego en Thr-172 las subunidades α (Figura 16).
6. Células HeLa no expresan LKB1 (Figura 17) y aunque represente una línea de célula “*Knock-out*” natural. El medicamento AICA ribosida y fenformina, activan AMPK en otros tipos de célula vía distintos mecanismos [33,34], no activan AMPK en células HeLa. Sin embargo, en células establemente transfectada con el ADN que expresa LKB1 de tipo salvaje (pero no a una mutante catalíticamente inactiva) un promotor inducible, la capacidad de AICA ribosida y la fenformina activa AMPK, para fosforilar Thr-172 sobre la subunidad AMPK α , y provoca la fosforilación de la diana descendente (ACC) y se restituye (Figura 18). Aunque la fenformina provoca una activación de AMPK y la fosforilación de Thr-172 mayor que AICA ribosida a estas células, por lo contrario es cierto para la fosforilación de ACC. La razón por lo que esto no es conocido, es que da la posibilidad de que los dos agentes esten activando de forma diferente las mezclas distintas de AMPK en diferentes ubicaciones subcelulares.

Aunque el polipéptido LKB1 fue sobre expresado en las células HeLa, el grado de activación de AMPK y la cantidad STRAD α y MO25 α que se precipita con LKB1 es en realidad más baja que en células 293 (Figura 17). Esto respalda las conclusiones en la Figura 15 con la demostración de que ambas subunidades suplementarias son necesarias para aumentar la capacidad de LKB1 de activar AMPK, y también de demostrar que la forma activa de LKB1 no está sobre expresada si se compara con las células 293. Los resultados en las células HeLa indican que LKB1 y sus subunidades suplementarias son tan necesarias como suficientes para la activación de AMPK en células intactas. Sin embargo, esto no se demuestra formalmente, porque si hay otras cinasas que actúan ascendente sobre AMPK, es concebible que éstas también sean eliminadas en células HeLa. Nuestros numerosos intentos en la purificación de AMPKKs de los extractos de hígado de rata han sido solamente detectando AMPKK1 y AMPKK2, que parecen representar ambos complejos LKB1-STRAD α -MO25 α . Sin embargo, como en cualquier protocolo de purificación de proteína la recuperación de la actividad no es cuantitativa, y no podemos descartar la posibilidad de que otras cinasas ascendentes podrían haber sido reconocidas. Tampoco detectaríamos cualquier cinasa ascendente que no este activa bajo las condiciones usadas en el ensayo. Por ejemplo, el ensayo es dirigido en presencia de EGTA, por eso no se detectaría alguna dependencia de las proteínas cinasas Ca^{2+} . Ya hemos demostrado que una cinasa de las proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKK) de cerebro de cerdo puede activar AMPK en ensayos de células libres [17], aunque es mucho más efectiva el activar la proteína cinasa dependiente de calmodulina, y no hay pruebas de AMPK fosforilados *in vivo*.

Ambos AMPKK1 y AMPKK2 parecen contener LKB1-STRAD α -MO25 α , y por lo tanto, no está claro actualmente porque se resuelve sobre la cromatografía de Q-*Sepharose*. Una diferencia interesante fue que el polipéptido LKB 1 en AMPKK1 pasó significativamente más rápido sobre SDS-PAGE que en AMPKK2 (Figuras 13 y 14). Se conoce que el LKB 1 es fosforilado hasta en ocho sitios, y es también farnesilado en Cys-433 cerca del extremo C-terminal [34-37]. Aunque sospechamos que la diferencia en la activación podría ser atribuible a una diferencia en la modificación covalente. Otra diferencia entre AMPKK1 y AMPKK2 son sus radios Stokes calculados por cromatografía de exclusión de tamaño (5,7 versus 5,2 nm respectivamente). Calculamos el radio de Stokes antes para AMPKK1 es 5,6 nm, y se combina esto con un coeficiente de sedimentación de 8,5 S obtenido por gradiente de centrifugación de glicerina y se ha obtenido un cálculo aproximado para la masa molecular de 95 kDa [14]. Suponiendo que AMPKK1 y AMPKK2 tienen una forma similar, esto produciría una masa molecular de aproximadamente 175 kDa para AMPKK2, que está razonablemente cerca de la masa molecular calculada (sin contar las modificaciones covalentes) 1: 1: 1 de un complejo LKB1-STRAD α -MO25 α de 140 kDa. Aunque no podemos descartar la posibilidad de que AMPKK1 contiene una proteína adicional asociada, y es posible que las diferencias en la modificación covalente entre AMPKK1 y AMPKK2 podrían afectar la forma del complejo y por lo tanto el radio de Stokes. Compatible con el comportamiento del AMPKK1 y los complejos de AMPKK2 sobre la cromatografía de exclusión de tamaño molecular, el LKB1 endogeno fue demostrado que migra notable sobre la gel filtración con una masa molecular evidente de 50-250 kDa, por el contrario a LKB1 antes de ser expresado en *E. coli*, que tiene una masa molecular evidente de 50 kDa [38]. Nuestros resultados confirman que usando un sustrato fisiológico probable en las conclusiones previas que usan un sustrato artificial (proteína mielina básica) una subunidad de STRAD que estimula la actividad cinasa de LKB1 [30], y la subunidad MO25 que estimula posteriormente la actividad, probablemente por estabilización del complejo LKB1-STRAD. (Ejemplo 1). Ninguna actividad de AMPKK fue obtenida con LKB1 recombinante a menos que una subunidad de STRAD también sea expresada, y la actividad fue incrementada considerablemente por la presencia adicional de una subunidad de MO25 (Figura 15). Es también perceptible que la cantidad STRAD α y STRAD β que precipita con LKB1 fue aumentada enormemente por la expresión de MO25 α y MO25 β (Figura 15) esto es compatible con nuestras conclusiones previas (Ejemplo 1). El mecanismo exacto por el que las subunidades STRAD y las de MO25 activan

LKB1 queda poco claro, pero estas subunidades suplementarias introducen el alcance para la regulación adicional de la cinasa. Ya es conocido que LKB1 es fosforilado en 2 sitios distintos STRAD α [30], y que STRAD α y MO25 α constituyen un complejo que conserva LKB1 en el citoplasma (Ejemplo 1). Es también interesante notar que tanto AMPK como su cinasa ascendente son heterotrimeros.

¿Se explica la activación de AMPK por la capacidad de LKB1 de actuar como un supresor de tumor y de detener el crecimiento celular y de la proliferación? Esto parece indudablemente explicable, porque aparte del hecho de que AMPK es un inhibidor general de biosíntesis [1,2], también hay pruebas acumuladas de que se puede regular el progreso a través del ciclo de la célula. Por ejemplo, la activación de AMPK impide la proliferación de células de HepG2 estabilizando p53 [13], y reduce el nivel del ARN que unido a proteína HuR en el citoplasma, reduce la estabilidad de los ARNs que codifican para las ciclinas A y B1 [12]. Curiosamente, la expresión de LKB1 en células G361 que no expresan la cinasa causan un arresto en la fase G1 que esta relacionada con una inducción de p21 que es dependiente sobre p53 [23,24].

Otra posibilidad excitante es que los complejos de LKB1-STRAD-MO25 también podrían actuar como cinasas ascendentes para otras proteína cinasas, de la misma manera en la que PDK1 fosforilada en residuos treonina en el lazo de activación de varias cinasas de la subfamilia de "AGC" [39]. Un dendrograma indica las relaciones entre las secuencias del dominio catalítico de 518 proteína cinasas de humanos que codifican en el genoma humano [40] donde se muestra que las subunidades de AMPK1 y AMPK2 están tendidas sobre una sub-rama pequeña que también contienen otras ocho proteínas cinasas (NuaK1, NuaK2, BrsK1, BrsK2, SIK, QIK, QSK y MELK; ver [41] para los detalles), la mayoría no ha sido investigada antes o se conoce muy poco. Una alineación de las secuencias del lazo de activación de estas cinasas son mostradas en la Figura 19, junto con aquellas subunidades C α catalítica de la sub-familia "AGC" de proteína cinasa de AMP-dependiente cíclica (PKA α , que puede ser fosforilada en el lazo de activación por autofosforilación) y la isoforma α de la proteína cinasa C (PKC α), que esta activado por fosforilación en el lazo de activación por PDK1. También se incluye en la Figura 19 el lazo de activación de las secuencias del *Arabidopsis thaliana* (AtSnRK1 α_1 , AtSnRK α_2) y de *Saccharomyces cerevisiae* (ScSnf1) homologas de AMPK, ambas ha sido demostrado anteriormente que son activadas por AMPKK de hígado de rata en el ensayo de células libres [42,43]. Todas en la secuencia están bien conservadas sobre el lado C-terminal del residuo de treonina que es el objetivo de la fosforilación, pero la subfamilia de AMPK/Snf1 están más conservadas sobre el lado N-terminal entre el motivo "DFG" invariable y el residuo de treonina. Las características de la secuencia que son conservados en la subfamilia de AMPK/SNF1, pero no en la familia "AGC" incluyen pares de residuos hidrofóbicos en posiciones -3, -2 y en las posiciones -9, -8. Las cinasas NuaK1 y NuaK2 y de AMPK/SNF1 de humano, planta y levadura también tienen un motivo "LSN" conservado en las posiciones -12 a la -10. Los restos estan determinados si en otras cinasas humanas de la subfamilia de AMPK son activados por la fosforilación del residuo de treonina del lazo de activación equivalente, y si podrían también ser dianas descendente para los complejos LKB1/STRAD/MO25. Si este es el caso, estas otras cinasas podrían mediar algunas de las funciones de supresión del tumor de LKB1. Desde el dominio catalítico en esta subfamilia que está estrechamente relacionado, a las otras regiones que tienden a ser más variables, uno podría especular que estas cinasas pueden ser activada por los diferentes *stress* o por los otros estímulos vía fosforilación junto a los complejos de LKB1/STRAD/MO25, y pueden mediar los efectos celulares diversos que son provocados por LKB1. Es también posible que pudieran compartir algunas dianas descendentes comunes con AMPK.

Conclusiones

Nuestros resultados proporcionan pruebas fehacientes, tanto en el ensayo de células libres y en células intactas, como entre los complejos LKB1-STRAD α/β y MO25 α/β , lo que constituye un gran postulado después que las cinasas ascendentes activan AMPK vía fosforilación en el lazo de activación de Thr-172. Debido que ya es conocido que la activación farmacológica de AMPK provoca la inhibición general de la biosíntesis, tanto como el arresto dependiente de p53 en la fase G1, la activación de AMPK por LKB1 podría explicar por lo menos en parte la capacidad del último de actuar como un supresor del tumor. LKB1 también puede actuar como una cinasa ascendente para otros miembros de la subfamilia de proteína cinasas de AMPK/SNF1.

Materiales y Métodos

Materiales, proteínas y anticuerpos

La proteína G-Sepharose en columna Q-Sepharose preempaquetada Amersham Pharmacia Biotech, UK. El dominio catalítico GST-AMPK α_1 fue expresado en *E. coli* y purificado como se describe anteriormente [44]. Anticuerpos de carnero contra las subunidades α_1 y α_2 de AMPK [45] LKB1 humano, MO25 α , MO25 β (ejemplo 1), y el anticuerpo fosfoespecífico contra el sitio Thr-172 sobre la subunidad AMPK α (anti-pT172) [46] fue descrito antes. El anticuerpo de carnero contra el dominio catalítico AMPK α_1 fue elevado contra del péptido CDPMKRATpIKDIKE (cisteína + residuos 252-264 de rata α_1 , Tp = fosfotreonina) usando el método descrito para el anti-pT172 [46]. Aunque se diseña como un anticuerpo fosfoespecífico, se reconoce el dominio catalítico GST-AMPK expresado en bacterias y el reconocimiento no se afecta por el tratamiento de fosfatasa de proteína. El anticuerpo monoclonal contra STRAD α que fue descrito anteriormente [30]. Fuentes de otros materiales y proteínas fueron descritos antes [14].

Ensayo de la Enzima

Las unidades definidas AMPK [14] y AMPKK [34] fueron ensayados, como se describe previamente. La lisis rápida de células para los ensayos AMPK fue descrito antes [47]. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado y los resultados son expresados con la media y desviación típica.

Purificación de AMPKK1 y AMPKK2

AMPKK fue purificado en el paso de Blue-Sepharose como fue descrito antes [14]. El flujo a través de esta columna fue ajustado a 160 mM NaCl por la dilución en tampón A (50 mM Hepes, 10% (p/v) de glicerina de 0,02% (p/v) de Brij-35, 1 mM de EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM de benzamidina, 0,1 mM de PMSF, 1 µg/ml del inhibidor tripsina soja), y se aplica a una columna de HiLoad 16/10 Q-Sepharose en un tampón A más 160 mM NaCl a 3 ml/minuto. La columna fue lavada en tampón A más 160 mM de NaCl hasta que la absorbancia A_{280} fue < 0,05, y la actividad de AMPKK fue luego eluida con un gradiente lineal (120 ml) de NaCl 160-400 mM tampón A.

Expresión de complejos LKB1 recombinante en células de HEK-293T

Varias combinaciones de GST-marcado LKB1, FLAG-marcado STRAD α ó STRAD β myc - marcado MO25 α o MO25 β se expresan en células HEK-293T y los complejos purificados sobre glutatión-Sepharose como se describe en el Ejemplo 1.

Fosforilación de dominio catalítico GST- α_1 usando [$\gamma^{32}P$] ATP

El dominio catalítico GST- α_1 (50 µg/ml), de cualquier tipo salvaje o de una mutante T172A [44] fueron incubados por 30 minutos y a 30°C con 5 mM de MgCl₂ y [$\gamma^{32}P$] ATP (200 µM; ~750 cpm/pmol) en presencia o ausencia del complejo GST-LKB1:STRAD α :MO25 α (20 unidades/ml). La reacción fue terminada por la adición de tampón de muestra SDS (Invitrogen), los polipéptidos resueltos por SDS-PAGE y el gel deshidratado es sometido a autoradiografía.

Preparaciones de heterotrimeros de AMPK recombinante

Los plámidos codifican myc- $\alpha_1\beta_1$ y γ que fueron expresados en células CCL13 [45], y las células cosechadas por el método de lisis rápida [47]. Los lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti myc y resuspendido en 50 mM NaHEPES, 1 mM de ditiotritol, 0,02% (w/v), Brij-35, pH 7,5.

Inmunoprecipitación de LKB1 endogeno

Inmunoprecipitación de LKB1 endogeno usando anticuerpo humano y proteína G-Sepharose es descrito en el Ejemplo 1. El ensayo cinasa cinasa fue conducido usando dominio catalítico GST- α_1 como sustrato en incubadora agitada como se describe antes para el ensayo de inmunoprecipitación de AMPK [47].

Células HeLa expresa LKB1

La generación de las células HeLa se expresa por inducción (Tet-ON) establemente del tipo salvaje o la mutante LKB1 cinasa inactiva, y en condiciones para su cultivo, han sido descritas anteriormente [32].

Análisis de proteína y electroforesis

La concentración de proteína fue determinada usando el método de tinción Bradford [48]. SDS-PAGE fue lograda usando geles de poli(acrilamida Bis-Tris) gradiente 4-12%, en los sistemas tampón MOPS (Invitrogen), excepto para el análisis de acetil-CoA carboxilasa, donde fue prerrepartido en geles de 3-8% Tris-acetato (Invitrogen). Proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (BioRad) usando el módulo de Blot de Xcell II (Invitrogen).

Detección de western blot por imágenes de infrarrojos

Para analizar la fosforilación de ACC, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE, transferido a nitrocelulosa (Bio-Rad) e incubada en tampón de bloqueo OdysseyTM que contenía 0,2% Tween-20 para 1 h. El anticuerpo anti-ACC (1,46 µg/ml en el tampón de bloqueo) fue luego añadido y agitado por 1 h. Las membranas fueron lavadas 6 x 5 minutos con TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,5 M de NaCl) más Tween-20 (0,2%). Las membranas fueron sumergidas en tampón de bloqueo 0,2% Tween-20 que contenía y 1 µg/ml de conjugado de carnero anti-IgG a IR tinción 680

(*molecular Probes*, Leiden, The Netherlands) y 1 µg/ml de estreptavidina conjugada para IR Dye 800 (*Rockland Inc.*, Filadelfia, PA) y se deja agitando por 1 h, protegido de la luz. Las membranas se lavan luego 6 x 5 minutos usando TBS-Tween (0,2%) y 1 x 5 minutos en PBS. Las membranas fueron escaneadas en dos canales diferentes usando el imager de IR Odyssey™, y los resultados cuantificados usando software de Odyssey™ y es expresado como una proporción de la señal obtenida con el anticuerpo pACC al obtenido con estreptavidina. El análisis de fosforilación del dominio catalítico GST-α₁ es similar, excepto que los geles 4-12% Bis-Tris fueron usados, y las membranas fueron monitoreadas simultáneamente por 1 h con anticuerpos de carnero anti-pT172 y los del dominio catalítico anti-AMPK, directamente marcado con el IR Dye 680 y el IR Dye 800 respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Referencias

1. **Hardie, DG, Scott, JW, Pan, DA, Hudson, ER:** *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. FEBS Lett.* 546, 113-120, 2003.

2. **Hardie, DG, Hawley, SA:** AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays*, 23: 1112-1119, 2001.

3. **Coven, DL, Hu, X, Cong, L, Bergeron, R, Shulman, GI, Hardie, DG, Young, LH:** *Physiologic role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the heart: graded activation during exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003.

4. **Horman, S et al.:** Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of Elongation Factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Current Biol.*, 12: 1419-1423, 2002.

5. **Krause, U, Bertrand, L, Hue, L:** Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, 269: 3751-3759, 2002.

6. **Bolster, DR, Crozier, SJ, Kimball, SR, Jefferson, LS:** AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through downregulated mTOR signaling. *J. Biol. Chem.*, 277: 23977-23980, 2002.

7. **Meisse, D, Van de Castele, M, Beauloye, C, Hainault, I, Kefas, B, Rider, M, Foulle, F, Hue, L:** *Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. FEBS Lett.*, 526: 38-42, 2002.

8. **Kefas, BA, Cai, Y, Ling, Z, Heimberg, H, Hue, L, Pipeleers, D, Van De Castele, M:** AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun N-terminal kinase. *J. Mol. Endocrinol.*, 30: 151-161, 2003.

9. **Kefas, BA, Heimberg, H, Vaulont, S, Meisse, D, Hue, L, Pipeleers, D, Van De Castele, M:** *AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic beta cells through stimulation of AMP-activated protein kinase. Diabetologia*, 46: 250-254, 2003.

10. **Stefanelli, C, Stanic, I, Bonavita, F, Flamigni, F, Pignatti, C, Guarnieri, C, Caldarera, CM:** Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis with 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243: 821-826, 1998.

11. **Blazquez, C, Geelen, MJ, Velasco, G, Guzman, M:** The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. *FEBS Lett.*, 489: 149-153, 2001.

12. **Wang, W et al.:** *AMP-activated kinase regulates HuR subcellular localization. Mol. Cell. Biol.*, 27: 3425-3436, 2002.

13. **Imamura, K, Ogura, T, Kishimoto, A, Kaminishi, M, Esumi, H:** Cell Cycle Regulation via p53 Phosphorylation by a 5'-AMP-Activated Protein Kinase Activator, 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1-beta-d-Ribofuranoside, in a Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287: 562-567, 2001.

14. **Hawley, SA, Davison, M, Woods, A, Davies, SP, Beri, RK, Carling, D, Hardie, DG:** Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver, and identification of threonine-172 as the major site at which it phosphorylates and activates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 271: 27879-27887, 1996.

15. **Sutherland, CM, Hawley, SA, Stark, MJR, Hardie, DG:** Identification of Elmlp as one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr. Biol.* 2003: submitted.

16. **Nath, N, McCartney, RR, Schmidt, MC:** *Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. Mol. Cell. Biol.*, 23: 3909-3917, 2003.

17. **Hawley, SA, Selbert, MA, Goldstein, EG, Edelman, AM, Carling, D, Hardie, DG:** 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 270: 27186-27191. 1995.
- 5 18. **Hemminki, A et al.:** A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 391: 184-187. 1998.
19. **Jenne, DE, Reimann, H, Nezu, J, Friedel, W, Loff, S, Jeschke, R, Muller, O, Back, W, Zimmer, M:** Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat. Genet.*, 18: 38-43. 1998.
- 10 20. **Hemminki, A:** The molecular basis and clinical aspects of Peutz-Jeghers syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55: 735-750. 1999.
21. **Escardillo, FM, Brensinger, JD, Tersmette, AC, Goodman, SN, Petersen, GM, Booker, SV, Cruz-Correa, M, Offerhaus, JA:** Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*, 119: 1447-1453. 2000.
- 15 22. **Boudeau, J, Sapkota, G, Alessi, DR:** *LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. FEBS Lett.*, 546: 159-165. 2003.
- 20 23. **Tiainen, M, Ylikorkala, A, Makela, TP:** Growth suppression by *LKB1* is mediated by a *G₁* cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9248-9251. 1999.
24. **Tiainen, M, Vaahtomeri, K, Ylikorkala, A, Makela, TP:** Growth arrest by the *LKB1* tumor suppressor: induction of *p21 (WAF1/CIP1)*. *Hum. Mol. Genet.*, 11: 1497-1504. 2002.
- 25 25. **Jishage, K et al.:** Role of *Lkb1*, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 8903-8908. 2002.
- 30 26. **Bardeesy, N, Sinha, M, Hezel, AF, Signoretti, S, Hathaway, NA, Sharpless, NE, Loda, M, Carrasco, DR, DePinho, RA:** Loss of the *LKB1* tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature*, 419: 162-167. 2002.
- 35 27. **Miyoshi, H, Nakau, M, Ishikawa, TO, Seldin, MF, Oshima, M, Taketo, MM:** Gastrointestinal hamartomatous polyposis in *LKB1* heterozygous knockout mice. *Cancer Res.*, 62: 2261-2266. 2002.
28. **Rossi, DJ et al.:** Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 12327-12332. 2002.
- 40 29. **Nakau, M, Miyoshi, H, Seldin, MF, Imamura, M, Oshima, M, Taketo, MM:** Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in *LKB1* gene knockout mice. *Cancer Res.*, 62: 4549-4553. 2002.
30. **Baas, AF, Boudeau, J, Sapkota, GP, Smit, L, Medema, R, Morrice, NA, Alessi, DR, Clevers, HC:** Activation of the tumour suppressor kinase *LKB1* by the *STE20*-like pseudokinase *STRAD*. *EMBO J.*, 22: 3062-3072. 2003.
- 45 31. **Boudeau, J, Baas, AF, FDeak, M, Morrice, NA, Kieloch, A, Schutowski, M, Prescott, AR, Clevers, HC, Alessi, DR:** MO25 isoforms interact with the *STE20*-related pseudokinase *STRAD* and enhance their ability to bind, activate and localise the *LKB1* tumour suppressor in the cytoplasm. *EMBO J.* 2003: submitted; Example 1.
- 50 32. **Corton, JM, Gillespie, JG, Hawley, SA, Hardie, DG:** 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.*, 229: 558-565. 1995.
33. **Hawley, SA, Gadalla, AE, Olsen, GS, Hardie, DG:** The anti-diabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*, 51: 2420-2425. 2002.
- 55 34. **Sapkota, GP, Deak, M, Kieloch, A, Morrice, N, Goodarzi, AA, Smythe, C, Shiloh, Y, Lees-Miller, SP, Alessi, DR:** Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (*ATM*)-mediated phosphorylation of *LKB1/STK11* at Thr-366. *Biochem. J.*, 368:507-516. 2002.
- 60 35. **Collins, SP, Reoma, JL, Gamm, DM, Uhler, MD:** *LKB1*, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP dependent protein kinase (PKA) and prenylated *in vivo*. *Biochem. J.*, 345 Pt 3: 673-680. 2000.
- 65 36. **Sapkota, GP, Kieloch, A, Lizcano, JM, Lain, S, Arthur, JS, Williams, MR, Morrice, N, Deak, M, Alessi, DR:** Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, *LKB1/STK11*, at Ser431 by p90 (RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for *LKB1* to suppress cell growth. *J. Biol. Chem.*, 276: 19469-19482. 2001.

37. **Sapkota, GP, Boudeau, J, Deak, M, Kieloch, A, Morrice, N, Alessi, DR:** Identification and characterization of four novel phosphorylation sites (Ser31, Ser325, Thr336 and Thr366) on LKB1/STK11, the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome. *Biochem. J.*, 362: 481-490. 2002.
38. **Boudeau, J, Deak, M, Lawlor, MA, Morrice, NA, Alessi, DR:** Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochem. J.*, 370: 849-857. 2003.
39. **Alessi, DR:** Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture. *Biochem. Soc. Trans.* 2001, 29: 1-14.
40. **Manning, G, Whyte, DB, Martinez, R, Hunter, T, Sudarsanam, S:** *The protein kinase complement of the human genome. Science*, 298: 1912-1934. 2002.
41. Kinase.com [<http://www.kinase.com/>].
42. **Sugden, C, Donaghy, PG, Halford, NG, Hardie, DG:** Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate HMG-CoA reductase, nitrate reductase and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiol.*, 120: 257-274. 1999.
43. **Wilson, WA, Hawley, SA, Hardie, DG:** The mechanism of glucose repression/derepression in yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Current Biol.*, 6: 1426-1434. 1996.
44. **Scott, JW, Norman, DG, Hawley, SA, Kontogiannis, L, Hardie, DG:** Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *J. Mol. Biol.*, 317: 309-323. 2002.
45. **Woods, A, Salt, I, Scott, J, Hardie, DG, Carling, D:** The $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity *in vitro*. *FEBS Lett.*, 397: 347-351. 1996.
46. **Sugden, C, Crawford, RM, Halford, NG, Hardie, DG:** Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.*, 19: 1-7. 1999.
47. **Hardie, DG, Salt, IP, Davies, SP:** Analysis of the role of the AMP-activated protein kinase in the response to cellular stress. *Methods Mol. Biol.*, 99: 63-75. 2000.
48. **Bradford, MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254. 1976.
49. **Devereux, J, Haeberli, P, Smithies, O:** *A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nuc. Acids Res.*, 12: 387-395. 1984.
50. **BOXSHADE v3.21** [<http://www.ch.embnet.org/software/BOXfbrm.html>].

Ejemplo 3

Sustrato de péptido para LKB1

Un ensayo de cinasa para LKB1 puede ser llevado a cabo usando un péptido como sustrato, por ejemplo usando el péptido AMPK de lazo T cuya secuencia es

LSNMMSDGEFLRTSCGSPNRRR

(residuos 163-181 de AMPK $\alpha 1$ humano 3 residuos de Arg adicionales que se adicionan al C-terminal para ser capaz de unirse a P81). El ensayo puede ser llevado a cabo de la siguiente manera. El otro ensayo usando tal péptido como sustrato puede ser usado, por ejemplo en un formato de salida alto. El ensayo estandar (50 μ l) conteniendo: 0,3 μ g de complejo GST LKB1-STRAD α -MO25 α purificado, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 y 0,1 mM EGTA, 0,1% (p/v) 2-mercaptoetanol, 10 mM de acetato de magnesio, 0,1 mM [γ^{32} P] ATP (~ 200 cpm/pmol) y el péptido con lazo T (LSNMMSDGEFLRTSCGSPNRRR, 10-2000 μ M). El ensayo se lleva a cabo durante 30 minutos a 30°C, luego de terminado el pipeteo de la mezcla de reacción en un 1 cm cuadrado de papel p81, es lavada con 6 cambios de 250 ml de 50 mM de ácido fosfórico (2 minutos cada lavado), el papel lavado una vez con 200 ml de acetona se seca. La radiactividad unida al papel p81 fue cuantificada por conteo de Cherenkov. 1 unidad de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la fosforilación de nmol de péptido por minuto.

El K_m para el péptido fue calculado y es $1,80 \pm 0,48$ y los V_{max} $23,4 \pm 3,5$.

Ejemplo 4

Activación de cinasas AMPK - relacionada por LKB1

- Otras 12 proteína cinasas (NUAK1, NUAK2, BRSK1, BRSK2, QIK, QSK, SIK, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4 y MELK) están estrechamente relacionada con la proteína cinasa AMP activada (AMPK). Aquí demostramos que LKB1 puede fosforilar el lazo T de todos los miembros de la subfamilia AMPK, (no demostrado para MELK), incrementando su actividad > 50 veces. La actividad catalítica de LKB 1 y la presencia de MO25 y STRAD son requeridas para activar todas las cinasas AMPK relacionadas. La mutación del lazo T con Thr fosforilado por LKB1 a Ala previene la activación, mientras que la mutación para Glu causa las formas activas constitutivas de muchas de las cinasas AMPK relacionadas. Los ensayos desarrollados para medir las actividades endógenas de las cinasas NUAK2, QIK, QSK, SIK, MARK1, MARK2/3 y MARK4 en células que expresan LKB1, y que son utilizadas para demostrar que las actividades de estas enzimas son notablemente reducidas en los fibroblastos LKB1 o en células HeLa que no expresan LKB1. Curiosamente, ni la actividad de LKB1, ni la de ninguna de las cinasas AMPK relacionadas son estimuladas por fenformina o AICA ribosida, dos medicamentos que producen la fosforilación y la activación de AMPK. Nuestros resultados indican que las funciones de LKB1 como una proteína cinasa ascendente madre, regula las actividades de cinasas AMPK relacionadas como con AMPK. Entre ellas, estas cinasas pueden mediar algunos de los efectos fisiológicos de LKB1, incluyendo su función de supresor de tumores.
- La inspección del quimoma humano indica que hay 12 proteína cinasas (BRSK1, BRSK2, NUAK1, NUAK2, QIK, QSK, SIK, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4 y MELK) que están estrechamente relacionadas con AMPK α 1 y AMPK α 2 (Figura 21A-B). La nomenclatura que empleamos "cinasas AMPK relacionadas" es sobre la base de la empleada por Manning y col. (Manning *et al.*, 2002). MARK3 es también conocida como PAR1A o C-TAK1 (Peng *et al.*, 1998; Spicer *et al.*, 2003), NUAK1 como ARK5 (Suzuki *et al.*, 2003b), NUAK2 como SNARK (Lefebvre *et al.*, 2001) y QIK como SIK2 (Horike *et al.*, 2003). El residuo de Thr con T lazo de AMPK α 1 y AMPK α 2 que son fosforilado por LKB1, y muchos de los residuos circundantes, son conservados en las cinasas AMPK relacionadas (Figura 21A & B). Esto indica que LKB1 también podría fosforilar lazo T del residuo Thr y regula las cinasas AMPK relacionadas en la misma manera que regula la actividad de PDK1 en un grupo de cinasas AGC relacionadas (Alessi, 2001). Las cinasas de MARK han sido propuestas que juegan un papel clave en el control de la polaridad de la célula y es conocido que esta regulada por la fosforilación de lazo T de su residuo Thr (Lewes y Nurse, 2003; Spicer *et al.*, 2003). Estudios en *Drosophila* indicaron que MARK3 podría encontrarse LKB1 ascendente (Martin and St Johnston, 2003), pero el reciente trabajo en células de mamíferos refutó esta conclusión y sugirió que LKB1 se encontrara ascendente de MARK3 y controla su actividad inicialmente (Spicer *et al.*, 2003). Es poco conocido sobre la función o el mecanismo de regulación de AMPK remanente en las enzimas AMPK1 relacionadas. En este ejemplo aunque tratamos de investigar el papel que juega LKB1 en la regulación de la actividad de cinasa AMPK relacionada.

Resultados

- Activación de cinasas AMPK relacionadas por el complejo LKB1. Se clona y expresa en *E. coli* las versiones de longitud completa de todas las doce cinasas AMPK relacionadas y el ensayo desarrollado para estas enzimas que empleaban el sustrato de péptido AMARA de AMPK para AMPK (Dale *et al.*, 1995), que no es fosforilado por el complejo de LKB1 (JML, datos no indicados). Encontramos que todas las cinasas AMPK relacionadas purificadas de *E. coli*, fosforilando este péptido que posee actividad de partida baja < 1 U/mg (1 unidad = 1 nmol de péptido fosforilado por minuto), con la excepción de MELK, que tiene una actividad de ~ 40 U/mg (Figura 21). Luego de la incubación de las cinasas AMPK relacionadas con el complejo LKB1:STRAD:MO25 y MgATP, la actividad de las cinasas relacionadas AMPK, se incrementa de 50 a 200 veces, excepto MELK cuya actividad apenas duramente se incrementa (Figura 21). LKB1 catalíticamente inactivo complica las cinasas relacionadas, que indican que la actividad de cinasa de LKB1 es requerida en STRAD α y MO25 α por falla para incrementar la actividad base de AMPK, indicando que es requerida la actividad de LKB1 (Figura 21).

- Activación de cinasas relacionadas con AMPK por LKB1 requiere STRAD y MO25. Para determinar la importancia de las subunidades STRAD y de MO25 en permitir que LKB1 active cinasas de AMPK relacionadas, expresamos GST - marcado LKB1, FLAG - marcado STRAD α/β y myc-marcado MO25 α/β en varias combinaciones en células 293, y purificado por afinidad los complejos sobre glutatión-Sepharose (Figura 22). Los complejos purificados fueron incubados en presencia de MgATP con cinasas AMPK relacionadas y su activación fue medida. LKB1 sobre sí mismo no activó ninguna cinasa de AMPK relacionada significativamente (Figura 22, comparación de carriles 1 y 14). El mismo resultado fue obtenido con LKB1 que había sido expresado con MO25 α ó MO25 β (Figura 22, carriles 4 y 5). Esto era de esperar, ya que estas proteínas no interactúan con LKB1 en ausencia de STRAD α/β (Ejemplo 1; Boudeau *et al.*, 2003a). Un complejo LKB1:STRAD α da una activación pequeña (Figura 22, comparación de carriles 1 y 2), pero un complejo heterotrimerico que contiene LKB1, STRAD α ó STRAD β , y MO25 α o MO25 β es requerido para obtener una activación grande (Figura 22, carriles 6 a 9). Como previamente fue reportado por AMPK α 1 (Figura 22 y Ejemplo 2; Hawley *et al.*, 2003), todas las cinasas de AMPK relacionadas fueron activadas más eficientemente por el complejo LKB1:STRAD α : MO25 α , aunque la efectividad relativa de diferentes complejos heterotrimerico variaba de sustrato a sustrato (Figura 22). Los complejos heterotrimerico que contienen una mutante inactiva catalíticamente de LKB1 es capaz de activar cualquier enzima (Figura 22, carriles 10-13). Debe ser indicado que cuando las isoformas de STRAD se expresan con LKB1 en ausencia de MO25, la cantidad de STRAD precipitado con LKB1 es reducido notablemente

(Figura 22, comparación de carriles 2 y 3 con carriles 6 y 7), como en M025 es requerido para estabilizar el complejo LKB1:STRAD (ejemplo 1; Boudeau et al., 2003a). *El complejo LKB1 fosforilado de cinasas AMPK relacionadas en el lazo de activación.* Como el complejo LKB1 fue mostrado previamente para fosforilar específicamente AMPK α 1 en su lazo de activación en Thr172, hemos mutados primero el lazo T del residuo equivalente en la cinasa AMPK relacionada (Figura 21A & B) con *Ala*, y evaluar cómo se afecta la fosforilación de estas enzimas junto al complejo LKB1. Demostramos que las cinasas de AMPK relacionadas tipo salvaje son fosforiladas por el complejo de LKB1 y la mutación hecha en el lazo T del residuo de Thr con *Ala* abolido o la fosforilación se reduce significativamente (Figura 23). También llevamos a cabo el análisis detallado del sitio de fosforilación de BRSK2 inactivo catalíticamente y la mutante NUA2 que han sido fosforilada *in vitro* por el complejo LKB 1 (figura 30). Las proteínas BRSK2 y NUA2 marcadas con P fueron digeridas con tripsina y los péptidos resultantes separados por cromatografía en una columna C₁₈. Los péptidos más importantes marcados con ³²P fueron analizados por espectrometría de masa y por secuenciación de Edman de fase sólida MALDI-TOF-TOF con lo que se demostraba que estas enzimas fueron fosforilada a su lazo T del residuo Thr (Figura 30).

Fosforilación de lazo T activa cinasas relacionadas con AMPK. Para estudiar el papel que tiene la fosforilación del lazo T de BRSK1, BRSK2, NUA1, NUA2, QIK, QSK, SIK y MELK, juega en su regulación, el lazo T de los residuos Thr de estas enzimas que fueron mutadas a cualquier *Ala* para prevenir la fosforilación, o *Glu* para la fosforilación mímica. En todos los casos, la actividad fundamental de las mutantes de *Ala* fue baja y su actividad no incrementó el complejo 1 (Figura 24) por incubación con el LKB1. Por el contrario, la actividad base de las mutantes *Glu* fue similar a la enzima fosforilada por LKB1 de tipo salvaje, y no se incrementa más adelante, luego de la incubación con el complejo LKB1 y MgATP (Figura 24). En el caso de MELK, la mutante *Ala* posee la actividad baja y la mutante *Glu* fue de actividad similar a la enzima de tipo salvaje, sugiriendo que MELK de tipo salvaje (de la misma manera que otras cinasas AMPK relacionadas) requeriría la fosforilación de lazo T para la actividad. Como MELK de tipo salvaje se expresó activa en *E. coli*, MELK puede poder catalizar la fosforilación de su propio lazo T del residuo Thr. Consistente con esto, el análisis MALDI TOF-TOF de MELK tipo salvaje que se expresa en *E. coli* determina que el lazo T es efectivamente fosforilado (Figura 30C).

Fosforilación y activación de cinasa Mark por LKB1. Los estudios previos han revelado que MARK3 y la cinasa MARK3, además de ser fosforilada en el lazo T del residuo Thr, son también fosforilados en un residuo de Ser cercano (Figura 21A y B y (Drewes et al., 1997; Johnson et al., 1996; Timm et al., 2003)). Mapeo péptido de MARK3 inactivo catalíticamente fosforilado por el complejo de LKB1, reveló que tanto residuos Thr211 como Ser215 dentro del lazo T fueron fosforilados (Figura 25A). Curiosamente, la mutante de MARK3 inactiva catalíticamente [T211A] no esta fosforilando a Ser215 por LKB1, pero la mutante MARK3 inactiva catalíticamente [S215A] todavía esta fosforilado Thr211 (Figura 25A). Investigamos cómo la mutación de lazo T del residuo Ser ó Thr afecta la activación de MARK3 por el complejo LKB1 (Figura 25C). La mutante MARK3 [T211A] no pudo ser activada por el complejo LKB1 pero la mutante de MARK3 [S215A] fue activada en una pequeña extensión. La mutante MARK3 [T211E] posee solamente ~ 15% de la actividad de la enzima de tipo salvaje activada por el complejo LKB1 y no pudo ser activada más adelante por LKB 1. La mutante MARK3 [S215E] esta inactiva y no pudo ser activada por LKB 1 (Figura 25C). Como era de esperar, también descubrimos que la mutación de lazo T de Thr por *Ala* en MARK1, MARK2 y MARK4 previno su activación por LKB1 (Figura 25D a F). La mutación del lazo T del residuo Thr para *Glu* en MARK1, MARK2 y MARK3, resultó en ninguna activación o solamente en una pequeña activación de estas enzimas (Figura 25D a F). Por el contrario, la mutación equivalente en MARK4, incrementa la actividad infinitamente (Figura 25F). Estudios de mapeo péptido y espectrometría de masa MALDI TOF-TOF demuestran que LKB1 fosforila lazo T de MARK4 en solamente el residuo Thr y no en el residuo Ser (Figura 25G y Figura 30C).

Identificación de sustratos de péptido para LKB1. Evaluamos si el complejo LKB1 podía fosforilar los péptidos que rodean el lazo de activación de AMPK, BRSK2, NUA2, SIK, MARK3 y MELK. Todos los péptidos estan fosforilados, pero con diferentes eficiencia (figura 26A). La secuenciación de Edman en fase sólida confirma que cada péptido fue fosforilado por LKB1 específicamente en el el lazo T del residuo Thr (figura 26B). El péptido sustrato óptimo derivado del lazo T de NUA2 fue fosforilado por LKB1 con un valor de Km 50 μ M y fue mejor sustrato que el péptido derivado del lazo T de AMPK (Km, 1,4 mM) (figura 26A). El péptido MELK es el sustrato más pobre. También ensayamos las diferentes combinaciones del complejo LKB1 STRAD y M025 usado en la figura 22, con péptidos con el lazo T como sustrato, y el patrón de actividad de LKB1 se refleja en lo observado cuando se usan proteínas de longitud completa (comparación de la Figura 22 y Figura 26C). Éstos resultados demuestran que los péptidos del lazo T pueden ser sustratos tan auténticos para medir la actividad de LKB1 en un ensayo fácil de un solo paso. El péptido NUA2 de lazo T fue nombrado *LKBtido*.

Papel de LKB1 en la regulación de cinasas AMPK relacionadas en fibroblastos. Para investigar el papel de LKB1 en la regulación de las cinasas AMPK relacionadas en células intactas, generamos anticuerpos contra secuencias específicas del péptido en las doce cinasas AMPK relacionadas. La capacidad de estos anticuerpos para inmunoprecipitar la forma activa de cinasa de AMPK relacionada fue ensayada empleando lisados de células HEK-293, en el que las cinasas han sido expresadas y encontradas activas (datos no indicados). Usando este enfoque se pueden desarrollar anticuerpos que inmunoprecipiten de forma selectiva cinasas AMPK relacionadas exceptuando MARK2 y MARK3, cuya actividad fue ensayada usando un anticuerpo comercial que inmunoprecipita ambas cinasas, pero no MARK1 y MARK4 (datos no indicado). Usando los anticuerpos específicos, podíamos inmunoprecipitar y ensayar NUA2 expresado endógenamente, QIK, QSK, SIK MARK1, MARK2/3 y MARK4 en fibroblastos en estado embrionario de ratón LKB1^{+/+} (MEFs) (Figura 27). Luego comparando las actividades de estas cinasas inmunoprecipitadas de LKB1^{+/+} y LKB1^{-/-} MEFs, descubrimos que la actividad de NUA2, QIK, QSK, SIK, MARK1 y MARK4 es redu-

cida entre 7 hasta 35 veces en el LKB1^{-/-} MEFs (Figura 27). La actividad de MARK2/3 combinada es reducida ~ 3-veces en LKB1^{-/-} MEFs (Figura 27G). La inmunotransferencia demostró que la actividad reducida de cinasas AMPK relacionada en células LKB1^{-/-} no es provocada por un decrecimiento en la expresión de las enzimas, y que tampoco estaban presente a los mismo niveles reducidos ligeramente en las células *knockout*.

Curiosamente, y por el contrario con AMPK α 1 (Figura 27A), las cinasas AMPK relacionadas ensayadas, no son estimulada significativamente con fenformina (Figura 27B a 27H). Esto indica que la fenformina no esta provocando la activación de AMPK por LKB1 activado. Consistente con esto, hemos demostramos que al incrementar la dosis de fenformina se activó progresivamente AMPK (y se incrementa la fosforilación de Thr172), pero no estimulamos la actividad LKB1 (Figura 28A). El medicamento ribosida de 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICA) activa AMPK en células intactas siendo tomada en cinasa de adenosina y cambiada a monofosfato de AICA ribosida, que imita el efecto de AMP sobre el sistema de AMPK (Corton *et al.*, 1995). AICA ribosida activó AMPK en LKB1^{+/+} MEFs, pero se deja de activar cualquiera de las cinasas AMPK relacionadas (Figura 28B).

Expresión de LKB1 restaura la activación de cinasas AMPK relacionadas en células HeLa. Para obtener las pruebas genéticas adicionales de que LKB1 actúa como un regulador ascendente de las cinasas AMPK relacionada, comparamos la actividad de cinasas AMPK relacionada en células HeLa, que no hacen expresar LKB1, con células HeLa que expresan establemente el tipo salvaje o LKB1 inactivo catalíticamente (Ejemplo 2; Hawley *et al.*, 2003; Sapkota *et al.*, 2002). En células HeLa control no se expresa LKB1, o en células que expresan LKB1 inactivo catalíticamente, la actividad de NUA2, QIK, QSK y SIK sería 20 a 40 veces menor que el observado en células HeLa (Figura 29B a 29E) que expresan LKB1 de tipo salvaje. La actividad de MARK1, MARK2/3 combinada y la actividad de MARK4 en células HeLa control estan aproximadamente ~2-3 veces menor que en las células que expresan LKB1 (Figura 29F a 29H). Contrario con AMPK α 1 (Figura 29A), ninguna de las cinasas AMPK relacionada fue activada significativamente cuando células HeLa estaban estimuladas con fenformina (Figura 29B a 29H).

Discusión

En este ejemplo proporcionamos las pruebas que funciona LKB1 para regular la actividad de 1 de los 12 miembros de la familia proteína cinasas AMPK relacionadas. En sistemas de células libres determinamos que todas las cinasas AMPK relacionada testadas, con la excepción de MELK, son activados sobre 50 veces seguido de la fosforilación del lazo T de su residuo Thr, junto al complejo de LKB1:STRAD:MO25. En la caso de MELK, nuestros resultados indican que esta enzima requiere fosforilación de lazo T para la actividad, pero que puede fosforilar su lazo T del propio residuo. A nuestro entender ésta es la primera demostración de que BRSK1, lo BRSK2, NUA1, NUA2, QIK, QSK, SIK tanto como enzimas MELK que pueden ser activado por fosforilación.

La mutación del residuo T1 de lazo T por Ala previno la activación de todas estas enzimas junto al complejo LKB1, mientras que su mutación para Glu es suficiente para activar BRSK1, BRSK2, NUA1, NUA2, SIK, QIK, QSK y MARK4 a las actividades específicas similares que las observadas para las formas fosforiladas por LKB1 de estas enzimas (Figura 24). Esta última conclusión podía ser explotada en el futuro en estudios de sobre expresión o impacto ("knocks-in") para introducir las formas activas constitutivas de estas enzimas en células para examinar su papel celular.

El trabajo previo ha indicado que MARK2 y MARK3 fueron fosforilada en el lazo T del residuo Thr tanto como en un residuo cercano Ser (Drewes *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1996). El lazo T fosforilado del residuo Ser en MARK2/MARK3 es conservado en AMPK α 1, AMPK α 2 y todas las cinasas AMPK relacionada (Figura 21A & B), pero por lo menos para AMPK α 1 no hay pruebas de que este residuo sea fosforilado *in vivo* (Woods *et al.*, 2003b). Nuestros análisis (Figura 25A y 25B), tanto como eso en un estudio reciente (Timm *et al.*, 2003), muestra esta fosforilación de la cinasa Mark de lazo T del residuo Thr, hace el papel más importante en regular la actividad de esta clase de cinasa. El complejo LKB1 fosforilado en una mutante MARK3 inactiva catalíticamente tanto del lazo T del residuo Thr como Ser (Figura 25A). Sin embargo, el péptido aislado del lazo T MARK3 es solamente fosforilado por LKB1 en el residuo de Thr (Figura 26), significando que la secuencia principal del péptido no es suficiente para permitir que LKB1 este fosforilado en el residuo Ser. El encontrar esa mutación del Thr-211 a Ala del lazo T sobre MARK3 previene la fosforilación de Ser215 junto al complejo LKB1, lo que indica que la fosforilación de Thr211 es requerida para la fosforilación de Ser215. MARK4 puede ser regulada de manera diferente cuando los estudios de péptido correspondientes indican que MARK4 es solamente fosforilado en el lazo T de Thr por LKB1 (Figura 25G), y esa mutación del lazo T de Thr a la Glu aumenta la actividad mucho más que la observada para otra isoformas MARK (Figura 25F). Antes fue reportado que para MARK2 esa mutación del lazo T para Glu incrementó su actividad específica en 3 veces (Timm *et al.*, 2003) y hemos hecho conclusiones similares con esta mutación de forma que incrementa 2.2 U/mg de actividad MARK2 en 6,7 U/mg (Figura 25D). Sin embargo, por lo contrario TAO1 solamente activa MARK2 en 10 veces (Timm *et al.*, 2003), el complejo LKB1 aumenta 200 veces la activación de MARK2, se establece que la mutación de lazo T MARK2 Thr a Glu no activa notablemente la cinasa.

Como se observa AMPK α 1 y AMPK α 2 para la activación de AMPK (Hawley *et al.*, 2003), la presencia de STRAD y subunidades de MO25 es esencial para LKB1 que activa todas las cinasas AMPK relacionada en el ensayo de célula libre. Hay pruebas considerables de que muchas cinasas de proteína dependen de los residuos, número de sitios de acoplamiento, que se encuentran en el exterior del núcleo catalítico, para llevar la cinasa y el sustrato junto. Es posible

que las subunidades STRAD y M025 tengan un papel facilitador en la interacción, y por tanto en la fosforilación por LKB1. La conclusión de que el complejo de LKB1:STRAD:M025 fosforilando el péptido de AMPK de lazo T corto y la cinasa AMPK relacionada, en una proporción mayor que LKB1, indicando que las subunidades STRAD y el M025 activan directamente LKB1. Sin embargo, este resultado elimina la posibilidad de que STRAD y M025 tampoco tienen un papel en el reconocimiento del sustrato.

Empleando MEFs LKB1^{-/-} y/o células HeLa que carecen de LKB1, que fueron capaz de demostrar que las actividades de NAK1, NAK2, QIK, QSK, y SIK expresadas endógenamente son 7 a 40 veces menores que en MEFs LKB1^{+/+} ó células HeLa que expresan LKB1 establemente de tipo salvaje. Esto proporciona las pruebas genéticas de que LKB1 esta en proporción limitada en la activación de estas enzimas en células intactas. Sin embargo, nuestros datos no eliminan la posibilidad de que otras cinasas puedan regular la actividad de las cinasas AMPK relacionada *in vivo* además de LKB1. Recientemente la cinasa TAO1 fue purificada de cerebro de cerdo como la actividad muy importante que fosforila el residuo de lazo T de Thr de MARK2, resultando en su activación (Timm *et al.*, 2003). Aunque TAO1 también activa MARK2 en estudios sobre expresión (Timm *et al.*, 2003), hasta ahora no ha sido reportada prueba genética que demuestre cómo afectó la actividad de la familia cinasa de MARK *in vivo* en ausencia de TAO1. Tales pruebas pueden ser dura de adquirir, cuando las células mamíferas poseen 3 isoformas de TAO estrechamente relacionadas (Manning *et al.*, 2002). La ausencia de anticuerpos inmunoprecipitados específicos quiere decir que no fueron capaces de establecer como una deficiencia de LKB1 puede afectar las actividades individuales de MARK2 o MARK3. Sin embargo, la conclusión de que la actividad combinada de MARK2 y MARK3 en células HeLa control y LKB1^{-/-} es sólida, implica que otras cinasas, como TAO1, pueden regular las actividades de estas enzimas. Debe ser observado que LKB1 y TAO1 no comparten homología de secuencia de aminoácido y se encuentran en regiones distintas del dendrograma de cinasa humano (Manning *et al.*, 2002). TAO1 pertenece al grupo de cinasas STE20 y aunque no se conoce si esto es importante están relacionado con STRAD α y STRAD β .

La familia de cinasas MARK (MAP, cinasa que regula la afinidad microtubular) es de los miembros de la familia cinasa AMPK relacionada más estudiados y se piensa que tiene un papel clave en establecer la polaridad de la célula. Por ejemplo, los estudios genéticos indican que homólogos de MARK controlan partición de cigote de *C. elegans* (Guo y Kemphues, 1995) y la formación del eje en estado embrionario en *Drosophila* (Shulman *et al.* 2000; Tomancak *et al.*, 2000). En células neuronales, cinasas MARK fosforilando las proteínas asociadas al microtubular neuronal Tau, resultan en la desestabilización de microtubulares (Drewes *et al.*, 1997). Curiosamente, el homólogo de LKB1 de mamífero en *C. elegans* (Watts *et al.*, 2000), se denomina PAR4, se identifica como un miembro de la familia del gen expresado maternalmente PAR (partición defectuosa), se requiere para establecer la polaridad de la célula durante el primer ciclo de embriogénesis de *C. elegans*. (Kemphues *et al.*, 1988). Las mutaciones letales maternales en el gen que codifica para PAR4 en *C. elegans*, ha demostrado que afecta algunos aspectos de la polaridad de la célula (Morton *et al.*, 1992). Éstos resultan en fenotipos similares a éstos observados en mutantes *C. elegans* del gen PAR1, que codifica al homólogo de MARK3 (Guo y Kemphues, 1995). Más reciente, ambos homólogos de LKB1 humano en *Drosophila* (Martin y St Johnston, 2003) como en *Xenopus* (Ossipova *et al.*, 2003) fueron demostrados que tienen un papel importante en regular la polaridad de la célula.

Originalmente, fue sugerido que LKB1 de *Drosophila* funciona descendente de PAR1/MARK3, cuando la sobre expresión de LKB1 de *Drosophila* suprimen la polaridad de mutantes del fenotipo PAR1/MARK3 (Martin y St Johnston, 2003). Sin embargo, en células HeLa que no expresan LKB1, MARK3 se encuentra que existe un estado fosforilado hacia dentro de LKB1 promoviendo la fosforilación de MARK3 en su lazo T (Spicer *et al.*, 2003), esto significa que LKB1 es ascendente a MARK3. Una explicación que conciliaría la discrepancia evidente entre los estudios en *Drosophila* y mamíferos sería si la sobre expresión de LKB1 en *Drosophila* suprime el fenotipo de polaridad de las mutantes de PAR1/MARK3, hasta la activación de otras cinasas AMPK relacionada, que pueden compensar la pérdida de la función de PAR1/MARK3.

Mucho menos se conoce respecto a la función de otras cinasas AMPK relacionada, es decir BRSK1, BRSK2, NAK1, NAK2, QIK, QSK y SIK. El anterior Northern blotting de NAK1, NAK2, QIK y SIK respecto a la función de otros grupos (ver abajo) y análisis de los clones EST (Tabla 2), esto indica que las cinasas AMPK relacionada con la excepción de BRSK1, BRSK2 y MELK son comunmente expresadas en muchos tejidos. Los clones EST de BRSK1 y BRSK2 son principalmente obtenidos de tejidos neuronales, después del análisis *immunoblot* de una variedad de tejidos de rata, estas enzimas solamente son observadas en el cerebro y en niveles bajos en los testículos (K. Sakamoto, resultados no publicados). Hasta la fecha, MELK (cinasa de cierre de leucina en estado embrionario maternal) ha sido reportado solamente expresado durante embriogénesis en mamíferos, con una expresión más fuerte detectada durante la maduración de los oocitos y solamente en el desarrollo de preimplantación (Heyer *et al.*, 1999; Heyer *et al.*, 1997). Aunque nuestros anticuerpos levantados contra BRSK1, BRSK2 y MELK fácilmente inmunoprecipitan las enzimas recombinantes, estas no son capaces de detectar su actividad en MEFs o células HeLa (OG, datos no demostrados). SIK (cinasa inducible) fue clonado de las glándulas suprarrenales de ratas alimentadas con una dieta alta en sales (Wang *et al.*, 1999). El ARNm de SIK también se produce por despolarización de la membrana en el cerebro (Feldman *et al.*, 2000) y los estudios recientes han indicado que cuando SIK se sobre expresa en células, podría tener un papel en la esteroidogénesis (Takemori *et al.*, 2003). El ARNm expresando QIK (también denominada SIK2), es mayor en tejido adiposo y, en estudios de sobre expresión, QIK fue reportado para fosforilar IRS1 humano sobre Ser794 (Horike *et al.*, 2003), el residuo equivalente a Ser789 en IRS1 de rata, demostrando que es fosforilado por AMPK (Jakobsen *et al.*, 2001). En otros estudios de sobre expresión, NAK1 (ARK5) fue demostrado que reprime la apoptosis producida por algunos estímulos, incluyendo la carencia de nutriente (Suzuki *et al.*, 2003a). Además, ha sido reivindicado que Akt/PKB fosforilando NAK1 en el sitio C-terminal del dominio catalítico, resulta en la activación

ES 2 308 198 T3

de 3 veces de la enzima (*Suzuki et al.*, 2003b). NUA2 (SNARK) es más expresado en el riñón, y su actividad según se reporta estimulada por células en carencia de glucosa (*Lefebvre et al.*, 2001, *Suzuki et al.*, 2003b). Para nuestro conocimiento, estudios previos no han estado dirigidos al papel de BRSK1, BRSK2 y OSK.

TABLA SUPLEMENTARIA

Distribución de tejidos de EST's que codifican para las cinasas relacionadas con AMPK indicadas

BRSK1			QIK		MARK1		
	Tejido	No.	Tejido	No.	Tejido	No.	
15	Cerebro	8	Ojo	17	Cerebro	17	
	Sistema nervioso	6	Hígado/Bazo	17	Carcinoide	12	
	Islets Langerhans	3	Sangre	14	Pecho	7	
	Tumor de pulmón	3	Cerebro	13	Tumor pulmón	6	
	Corazón	2	Pecho	10	Páncreas	5	
20	Otra repidermis, ojo fetal, próstata, 1 por tipo tejido		Intestino	11	Ojo	4	
			Tumor intestinal	10	Otros (pecho, uello/cabeza, riñón, sistema nervioso, placenta) 3 tipo de tejido		
BRSK2			Melanocitos	9			
	Tejido	No.	Sistema nervioso	9			
25	Ojo	14	Insulinota	7	MARK2		
	Sistema nervioso	13	Pulmón	7	Tejido	No.	
	Pecho	10	Placenta	7	Cuello/cabeza	18	
	Cerebro	8	Corazón	6	Cerebro	17	
	Células gérmenes unido	3	Fibroblasto	6	Intestino	13	
30	Células de tumores varios	7	Riñón	5	Adenocarcinoma	11	
			Células de tumores varios	5	Páncreas	9	
			Otros (próstata, utero, testículo, cabeza, páncreas, hueso, estomago) menor que 5 por tipo de tejido.		Placenta		
NUAK1					Ojo	8	
35	Cerebro	18			Sangre	7	
	Sangre / Plasma	7			Melanoma	6	
	Hígado / bazo	5			Otros(próstata, riñón, pulmón, hueso, utero, timo, sistema nervioso) menor que 6 por tipo de tejido		
40	Ojo	4	SIK				
	Utero	4	Tejido	No.			
	Próstata	3	Utero	12			
	Células de tumores varios	9	Adenocarcinoma	12			
	(pulmón, cuello/cabeza, pecho, tejido adiposo, placenta, celulas madres embrionarias) menor que 3 por tipo tejido		Tumor instestinal	12	MARK3		
45			Tumor cerebro	11	Tejido	No.	
			Pecho	9	Cerebro	29	
			Riñón	8	Sistema nervioso	26	
			Melanocitos	7	Hígado/Bazo	23	
			Sangre / plasma	7	Ojo	21	
50	Tejido	No.	Estomago	6	Placenta	19	
	Sangre	18	Cerebro	5	Pulmón	17	
	Placenta	6	Corazón fetal	5	Colón	8	
	Cerebro	6	Corazón	5	Estomago	7	
	Ovarios	6	Cabeza / cuello	5	Corazón	6	
55	Sistema nervioso	3	Otros (placenta, tumor cervical, timo, hígado,		Utero	6	
	Riñones	2			Riñón	6	

ES 2 308 198 T3

Colón	2	pulmón, próstata,	Músculo esquelético	5
Ojo	2	médula, ojo, tumor	Cervix	5
Células de tumores varios	10	vejiga) menor que 5 por tipo de tejido.	Sangre	5
5 (músculo, cabeza/cuello, cerviz, pulmón) 1 por tipo tejido.		QSK	Celulas tumorales varias Otros	102
MELK		Tejido	(próstata, testículo, páncreas, timo, médula, pecho) menor que 5 por tipo de tejido	
Tejido		Hígado/Bazo		
		Carcinoma de pulmón		
10	No.	Cerebro		
Sangre	7	Cuello / cabeza	MARK4	No
Adenocarcinoma	7	Tumor sist nervioso	Tejido	
Estomago	5	Adenocarcinoma	Cerebro	13
Células B germinales	5	Placenta	Ojo	13
15 tumores células gérmenes	4	Melanocitos	Tejido nervioso	11
Ascitis	4	Páncreas	Hígado/Bazo	7
		Ojo	Colon	4
		Ojo	Estomago	3
20 Otros (pulmón, cuello/cabeza, pecho, tejido adiposo, placenta, células madres embrionarias) menor que 3 por tipo tejido		Carcinoide	Pecho	3
		Sangre	Próstata	3
		Riñón	Testículo	2
		Otros (pecho, intestino, testículos, pulmón, utero, corazón) menor que 6 por tipo de tejido	Pulmón	2
25			Celulas tumores varias	43

30 Evidentemente un trabajo adicional tiene que ser llevado a cabo para la posterior caracterización del mecanismo de regulación y función de las cinasas AMPK relacionada. Nuestros estudios indican que, por lo menos en MEFs y células HeLa que expresan LKB1 establemente, las cinasas AMPK relacionada no fueron activadas en respuesta al medicamento fenformina o AICA ribosida, contrario con AMPK. Esto indica que los efectos anti-diabético beneficiosos de la fenformina y la metformina pueden estar mediados a través de la activación de AMPK en vez de las cinasas AMPK relacionada. La conclusión de que las cinasas AMPK relacionada no son activados junto a la fenformina o AICA ribosida, es compatible con nuestras conclusiones que estos tratamientos no activan LKB1 directamente en LKB1^{+/+} MEFs (Figura 28A) o en células COS7 (Woods *et al.*, 2003a). En estudios futuros es importante definir los estímulos fisiológicos que causan la activación de las cinasas AMPK relacionada, y de determinar si estas enzimas, de la misma manera que AMPK, poseen subunidades reguladoras que controlan su activación.

40 Un número importante de las formas heredadas de PJS se encuentran en ciertas familias que no hacen las mutaciones indicadas en el gen de LKB 1 (Buchet-Poyau *et al.*, 2002; Resta *et al.*, 2002), indicando que hay un segundo punto causativo para PJS. Evidentemente ahora es crítico encontrar si las familias PJS expresan la proteína LKB1 normal que tiene mutaciones en otras cinasas relacionadas con AMPK.

45 Como conclusión, hemos demostrado que las funciones de LKB1 como una proteína cinasa ascendente activa 11 cinasas de AMPK relacionada y además de AMPK α 1 y AMPK α 2. Es posible que estas enzimas medien algunos de los efectos fisiológicos anteriormente atribuidos a LKB1 y que una o más de estas cinasas podría ellas mismos funcionar como represores de tumores.

50 **Materiales.** Tabletas del cóctel inhibidores de proteasas y tripsina de grado secuenciador fueron obtenidas de Roche. La N-octilglucosida es de Calbiochem, y los reactivos de cultivo de tejido son de Life Technologies. Los sueros bovinos fetales libre de Tetraciclina (FBS) son de Perbio, y otros reactivos de cultivo de tejido son de Biowhittaker. Geles de 4-12% y 10% de Bis-Tris poliacrilamida que fueron obtenidos de Invitrogen; el papel de fósforocelulosa de P81 era de Whatman; Fenformina de Sigma y AICA ribosida de TorontoXX. [γ ³²P] ATP, Sepharose glutatión, proteína G-Sepharose fue comprada de Amersham Bioscience. Todos los péptidos fueron sintetizados por el Dr. Graham Bloomberg en la universidad de Bristol.

Anticuerpos

60 Los siguientes anticuerpos fueron cultivados en carneros y purificados por afinidad sobre el péptido antígeno apropiado:

65 BRSK1 (MVAGLTLGKGPEPDGDVS, residuos 1-20 de humano BRSK1), BRSK2 (LSWGAGLKGQKVATSYESSL, residuos 655-674 de humano BRSK2), NUA1 (MEGAAAPVAGDRPDGLGAPG residuos 1-21 de humano NUA1), NUA2 (TDCQEVATYRQALRVCSKLT, residuos 653-673 de humano NUA2), QIK (MVMADGPRHLQRPVRVGFYD, residuos 1-21 de humano QIK), SIK (MVMSEFSADPAGQGQGGQK, residuos 1-20 de humano SIK usado for inmuno precipitación from humano cells), SIK (GDCEMEDLMPCSLGTFVLVQ, residuos

765-784 de humano SIK usado por inmuno precipitación de células de ratón), QSK (TDILLSYKHPEVSFSMEQAGV, residuos 1349-1369 de humano QSK), MARK1 (SGTSIAFKNIASKIANELKL, residuos 776-795 de humano MARK1), MARK4 (MSSRTVLAPGNDRNSDTHGT, residuos 1-20 de humano MARK4), MELK (MKDYDELLKY-YELHETIGTG, residuos 1-20 de humano MELK). El anticuerpo AMPK α 1 específico empleado en las Figuras 27, 28B y 29 que fue levantado contra el péptido (CTSPDPSFLDDHHLTR, residuos 344-358 de AMPK α 1 de rata) mientras el anticuerpo que reconocía tanto AMPK α 1 como AMPK α 2 empleado en la Figura 28A, fue levantado contra el péptido (residuos 252 a 264 de CDPMKRATIKDIRE o AMPK α 1 de rata). Los anticuerpos contra péptidos MARK2 y MARK3 que levantamos fueron específicos cuando inmunoprecipita a otras isoformas MARK. El anticuerpo de MARK3 Upstate Biotech (anti c-TAK # 05-680), levantado contra la proteína MARK3 humano fue encontrado para inmunoprecipitar MARK2 tan eficientemente como MARK3 pero no inmunoprecipita MARK1 y MARK4 (datos no indicados). Los anticuerpos fosfoespecíficos reconocen AMPK fosforilado en el lazo-T fueron generados como se describió anteriormente contra el péptido (residuos 168 a 180 de KFLRT (P) SCGSPNYA de AMPK α 1 de rata) (Sugden *et al.*, 1999). El anticuerpo LKB1 usado por *immunoblotting* fue levantado en carnero contra LKB1 de ratón (Sapkota *et al.*, 2001) y esto por inmunoprecipitación fue levantado en carnero contra la proteína LKB1 humano (Boudeau *et al.*, 2003). El anticuerpo monoclonal que reconoce que el epitope tag de HA es de Roche, el anticuerpo monoclonal que reconoce los epitopes GST y FLAG son de Sigma. Los anticuerpos *anti myc* fueron preparados por precipitación de sulfato de amonio de medio de células de hibridoma Myc1-9E10 creciendo en RPMI 1640 con medio complementado con 2 mM de glutamina y 15% (v/v) suero bovino fetal. Anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa *horseradish* usado por *immunotransferencia* fueron obtenidos de Pierce.

Métodos generales y tampones. Digestiones con enzimas de restricción, ligandos de ADN, y otros procedimientos de ADN recombinante fueron llevados a cabo usando protocolos estandares. Todas las mutagenesis fueron llevadas a cabo usando el *QuikChange* dirigido al sitio por el método de mutagenesis (*Stratagene*). Los conceptos de ADN usados por transfección fueron purificadas de *E. coli* DH5 α usando el conjunto mega plásmido *Qiagen* de acuerdo con el protocolo del fabricante. Todas las construcciones de ADN fueron verificadas por secuenciación de ADN, que fue llevado a cabo por el servicio de secuenciación, la *School of Life Sciences*, University of Dundee, Scotland, UK, usando *DYEnamic ET terminator chemistry* (Amersham Biosciences) sobre Secuenciador ADN automatico *Applied Biosystems*. El tampón de Lisis contiene 50 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM de EGTA, 1 mM EDTA de 1% Triton-X 100 (w/v), 1 mM ortovanadato de sodio, 50 mM fluoruro de sodio, 5 mM pirofosfato de sodio, 0,27 M de sacarosa, 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol y cóctel inhibidor de proteínasa de "Complete" (una tableta/50 ml). El tampón A contiene 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,1 mM EGTA, y 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol. El tampón de muestra de SDS contiene 50 mM de Tris/HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glicerina, 0,005% (w/v) color azul bromofenol y 1% (v/v) 2-mercaptoetanol.

Clonación de cinasas relacionadas con AMPK

NUAK1. Para obtener la región que codifica para NUAK1 cADN humano (NCBI Acc. NM 014840) una reacción de PCR fue llevada usando una librería de ADNc de cerebro (*Clontech*) como plantilla y el *sense primer* 5'-actgcagccctggagcccggaagc-3' y el *sense primer* 5'-ctagttagcttgctgcagatctccagcgc-3'. El producto PCR da como resultado para cubrir la región que codifica para NUAK1 desde los residuos de aminoácido 31-661. El ADNc pierde 31 aminoácidos del N-terminal y fue incluido en la plantilla 5' de otra reacción de PCR, luego HA tag fue añadida por PCR usando el *sense primer* 5'-ggggccgcccgcctgtggcgggg-3' y el *sense primer* 5'-actagtgcaccatgta cccatagatgtgc cagattacgccgaa-3' y el *sense primer* de 5'-ctagttagcttgctgcagatc tccagcgc-3'. El producto PCR da como resultado fue ligado en el vector pCR2.1-TOPO (*Invitrogen*), y subclonado como un fragmento de *SpeI-NotI* dentro pEBG2T (Sanchez *et al.*, 1994) y como un EcoRI - inserto EcoRI en los vectores de expresión de pGEX6P-1 (Amersham).

NUAK2. La región que codifica para ADNc humano NUAK2 (NCBI Acc NP 112214) con un HA tag en el N-terminal, es amplificado por PCR de 6718982 de clon de EST (NCBI Acc CA487493) con plantillas 5'-actagtgcaccatgtaccatagatgtgc cagattacgccgagtcgctgttttcgcgcggcgctcc-3' y 5'-tcaggtgagctttgagcagaccctcagtgctg-3'. El producto de PCR que da como resultado esta ligado en el vector de pCR2.1-TOPO, secuenciado, y clonado como un fragmento *SpeI-SpeI* en pEBG2T y como un Inserto de de EcoRI-EcoRI en vectores de expresión pGEX6P-1.

QIK. La región que codifica ADNc de QIK humano (NCBI Acc XM041314) con un HA tag en el N-terminal es amplificado desde consorcio IMAGEN clon EST 5495545 (NCBI. Acc BM799630) usando plantillas 5'-gcgtcgactaccatagatgtgccagattacgccgctcat ggcggatggcccgag-3' ó 5'-gcactagttaccatagatgtgccagattacgccgctcatggcgatggcccgag-3' para clonar en los vectores pGEX6P-3 y pEBG2T respectivamente, y la plantilla *antisense primer* 5'-gagcggccgctaatt caccagacatacccggtgtg-3'. Productos de PCR amplificados fueron ligados en el vector pCR2.1-TOPO, secuenciado, y clonado en un inserto *Sall-NotI* o *SpeI-NotI* en pGEX6P-3 ó pEBG2T respectivamente.

SIK. La región que codifica ADNc de SIK humano (NCBI. Acc NM 173354) con con un HA tag en el N-terminal es amplificado desde consorcio IMAGEN clon EST 4831049 (NCBI Acc NM 173354) usando las plantillas 5'-gcggatcc taccatagatgtgcc agattacgccgttatcatgtcggagttcagcgcgg-3' y 5'-gagcggccgctcactgcaccaggacaaacgtgcc-3. Productos de PCR amplificados fueron ligados en el vector de pCR2.1-TOPO, secuenciado, y clonado en un inserto *BamHI-NotI* en pGEX6P-1 y pEBG2T.

MELK. La región que codifica ADNc de MELK humano (NCBI Acc NM014791) con con un HA tag en el N-terminal es amplificado desde consorcio IMAGEN clon EST 4547136 (NCBI Acc BC014039) usando las plantillas 5'-gcggatcc taccatagatgtgcc gattacgccaagattatgatgaactctcaaatattatgaattacatg-3' y 5'-gtgcggccgcttatacttgacgactaga

taggatgtcttc-3'. El producto de PCR amplificado fue ligado en el vector pCR2.1-TOPO, secuenciado, y clonado en un inserto de *BamHI-NotI* en pGEX6P-1 y pEBG2T.

BRSK1. Nucleótidos 60-1010 de la región que codifica ADNc de BRSK1 humano (NCBI Acc. NM032430) es amplificado desde consorcio IMAGEN clon EST 6154749 (NCBI Acc BQ434571) usando las plantillas 1. 5'-ccacccc caccaccccagcagc ccaatatgtggccctatcggtggagaagacgtgggcaagg-3' y 2. 5'-cgatgcagcctctcgcggtccctgaagcagc-3', nucleótidos 60-106 es añadido por plantilla 1. Nucleótidos 980-2337 de BRSK1 fue amplificado del mismo clon EST usando las plantillas 3. 5'-gctgctcaggg accgcgagaggtgcatcg-3' y 4. 5'-tcagggcagaggggtccgttggtggcc-3'. Cada producto de PCR fue ligado en el vector PCR2.1-TOPO y secuenciado. Una diferencia simple del nucleótido comparado con la secuencia de BRSK1 NM 032430 que está presente en el clon EST fue "Corregida" por mutagenesis dirigido al sitio en el clon PCR2.1-TOPO que contiene la mitad del 5' de BRSK1. El remanente del 5', 59 nucleótidos de BRSK1 y por la HA tag es añadido a la mitad del 5' de BRSK1 por PCR usando las plantillas 5. 5'-gggtgggggtctcccgcc taccactccccacccccacccccacccagcagcccaat atg-3' y 6. 5'-ggatcctaccatacagatgtgccagttacgctctgcccggggccaag gagggaggtgggggtctc cgg cctacc-3'. El producto final de PCR fue ligado en el vector PCR2.1-TOPO y secuenciado. Superposición de PCR fue efectuado luego usando la mitad 5' y la mitad 3' de BRSK1 como plantillas y primer 7. 5'-gcggatcctaccatacagatgtgcc-3' y 4 y el producto de PCR ligado en el vector de PCR2.1-TOPO y secuenciado. El ADNc de BRSK1 de longitud completa con el N-terminal HA tag es luego subclonado dentro de pGEX6P-1 y pEBG2T como un inserto de *BamHI-BamHI*.

BRSK2 La región que codifica ADNc de BRSK2 humano con un HA tag en el N-terminal (NCBI Acc AF533878) es amplificado desde consorcio IMAGEN clon EST 6144640 (NCBI Acc BU193218) usando las plantillas 5'-ggatccgc caccatgtaccata cgatgtgccagattacgccacatcgacggggaaggacggcgccg-3' y 5'-gcggccgctcagaggtactctcg tagctgtggccac cttctggccctaagccca-3'. El producto de PCR da como resultado que fue clonado en vector pCR2.1-TOPO, secuenciado, y clonado en un inserto de *BamHI-NotI* en vectores de pEBG2T y pGEX6P-1.

QSK. Nucleótidos 55-640 de la región que codifica ADNc de QSK humano (la secuencia obtenida de base de datos Sugen www.cinasa.com (Manning *et al.*, 2002)) es amplificado desde consorcio IMAGEN clon EST 4396995 (NCBI Acc.BF983268) usando las plantillas 1. 5'-ggagccgggcccggcgccgctgctcctcgcccgccgggggtccca gccgccccgctgcc gtgcccctcgccggccgagccg-3' y 2.-5' tgaagaggtactgaaacaaaatctgcta tttgatattc-3', nucleótidos 55-110 es añadido por el primer 1. Los 54 nucleótidos restantes del 5' y el HA tag fue añadido por PCR usando las plantillas 3. 5'-gat tacggcgccggcgccggcgagcgagctggcggggctccggggcgccgagctgggggagccggcgccgctgctg-3' y 4. 5'-gcggatcc taccatacagatgtgccagattacgcggcgccggcgccggcgga gcgg-3'. El producto de PCR final fue ligado en el vector PCR2.1-TOPO y secuenciado para producir clon QSK de pCR2.1. Los nucleótidos 610-865 de QSK son amplificados desde consorcio IMAGEN clon EST 6247938 (NCBI Acc BQ685213) usando las plantillas 5. 5'-atagcagatgttggttcagtaacctct cactcctgggcagctgctgaagacctggtgtggcag cctcccta tgctgcacctgaactc-3' y 6. 5'-ctgtggacataaaaaatgggatcggaactttcc-3', los nucleótidos 610-674 son añadidos por primer 5. El producto de PCR fue ligado en el vector de PCR2.1-TOPO y secuenciado. Una simple supresión del nucleótido en QSK por la posición 696 del marco de lectura abierto, que está presente en el clon EST, fue corregido por mutagenesis dirigida en el sitio para producir el clon 2 de QSK pCR2.1. Los productos de PCR de clones 1 y 2 de QSK de pCR2.1 fueron introducidos dentro por superposición en PCR usando las plantillas 4 y 6. Este producto (nucleótidos QSK 4-865 con HA tag) esta ligado en el vector PCR2.1-TOPO y secuenciado para producir el clon 3 QSK pCR2.1 de productos.

Los nucleótidos de QSK 832-4110 son amplificados desde el consorcio IMAGEN clon EST 360441 (NCBI Acc AA015726) usando las plantillas 7. 5'-ggaaagtccgcaccc catttttatgtccacag-3' y 8. 5'-gagcgccgcttacacgctgcctgctc catgc-3'. El producto de PCR fue ligado en el vector de PCR2.1-TOPO y secuenciado para producir el clon 4 de QSK de pCR2.1. Productos de PCR de clones 3 y 4 de QSK de pCR2.1 son introducidas por PCR usando las plantillas 4 y 8 para generar el ADNc de QSK de longitud completa con el N-terminal HA tag. El producto de PCR fue ligado en el vector PCR2.1-TOPO y secuenciado para producir clon 5 de QSK de pCR2.1. El clon 5 QSK de longitud completa con el N-terminal HA tag fue revelado de pCR2.1 desde el clon 5 QSK como un inserto de *BamHI-BamHI* dentro de los vectores pEBG2T y pGEX6P-1. Para generar las mutaciones de lazo T en el QSK, las mutagenesis fueron llevadas a cabo sobre el clon 3 de QSK de pCR2.1, seguida por superposición en PCR para generar las mutantes de longitud completa de QSK. El producto de PCR superpuesto fue ligado en PCR2.1-TOPO, secuenciado y clonado dentro de pEBG2T y pGEX6P-1, los insertos *BamHI-BamHI*.

MARK1. Nucleótidos 4-1078 de la región que codifica ADNc MARK1 humano (NCBI Acc NM 018650) con un HA tag en el N-terminal fue amplificada de una librería de ADNc de cerebro humano que usa las plantillas 5'-gcgaattctaccatacagatgtgc cagattacgctcgcccgagccattgc-3' y 5'-catcatactctgattattaaggcatcatttttc-3'. Nucleótidos 1042-2388 de MARK1 fue amplificado desde el clon EST 48109 del consorcio IMAGE (NCBI Acc H11850) usando 5'-gaaataaatgatgccttaataatcagaag tatgatg-3' y 5'-gagtcgacttacagcttaagctcattgtctattttgatgc-3'. Los productos PCR amplificados son introducidos por PCR para generar ADNc MARK1 HA identificado de longitud completa. El producto de PCR fue ligado en el vector PCR2.1-TOPO, secuenciado, y subcloned como un Inserto de *EcoRI-SalI* en pGEX6P-1. El MARK1 de HA titulado de longitud completa fue amplificado desde el clon MARK1 vector pCR2.1-TOPO que fue secuencialmente clonada dentro de pEBG2T con un inserto *KpnI-NotI* usando plantillas 5'-gcggatcc taccatacagatgtgccagattacgcctcgg cccggacgccattgc-3' y 5'-gagcgccgcttacagcttaagctcattgtctattttgatgc-3'.

MARK2. La región de codificación de MARK2 ADNc humano (Acc de NCBI. NM 004954) es amplificado desde el clon EST 4591688 del IMAGE (NCBI Acc BG419875) usando las plantillas de detección para los que 5'-gcgtcgactacc catacagatgtgccagatt acgccattcgggcgcaactcagcc-3' o 5'-gcactagttaccatacagatgtgccagattacg ccatcgggggccg caactcagcc-

3' por clonación siguiente en los vectores pGEX6P-3 y pEBG2T respectivamente, y la plantilla de antidección 5'-gagcgccgcttaagcttcagctc gttgg ctttttg-3'. Los productos de PCR amplificados son ligados en vector PCR2.1-TOPO, secuenciados, y clonados como un Inserto *Sall-NotI* o de *SpeI-NotI* en vectores pGEX6P-3 o pEBG2T respectivamente.

MARK3. La región que codifica ADNc de MARK3 humano (NCBI. Acc NM 002376) con un HA tag en el N-terminal es amplificado con IMAGE desde el clon EST 5104460 (NCBI Acc BI223323) usando las plantillas 5'-gcgccgcagccaccatg tacccatagcatgtgccagattacgctccactaggacccttgccaacgggtga-3' y 5'-gcgccgcgttacagcttta gct cattggcaattttggaagc-3'.

El producto de PCR fue clonado en el vector de PCR2.1-TOPO, secuenciado, y clonado como un Inserto de *NotI-NotI* en los vectores pEBG2T y pGEX6P-2.

MARK4. Para obtener la región que codifica para la longitud completa de ADNc de MARK4 humano (NCBI Acc.AK075272) dos clones EST fueron usados como plantillas para las reacciones de PCR. Los primeros 228 aminoácidos HA tag en el N-terminal es amplificado desde consorcio IMAGE clon EST 6301902 (NCBI Acc BQ709130) usando las plantillas 1. 5'-agatctgccaccatgtacccatagcatgtgccagattacgcc tcttcgcgacgggtgctggccccggg-3' y 2. 5'-tgccctgaaacagctccggggcggc-3'. La región restante que codifica es amplificada desde el consorcio IMAGE clon EST 5503281 (NCBI. Acc BM467107) con las plantillas 3. 5'-gggatcgaagctggacacgttctgc-3' y 4. 5'-geggccgctcacactccaggggaatcgagcagccggg-3. Los productos de PCR resultantes fueron usados como plantillas en una reacción de PCR con las plantillas 1 y 4. El producto de PCR esta ligado en PCR2.1-TOPO, secuenciado, clonado y luego más adelante como un Inserto *BglII-NotI* en el sitio *BamHI-NotI* de vectores pEBG2T y pGEX6P-1.

Otras construcciones de ADN. Las construcciones de ADN que codifican para GST-LKB1 de tipo salvaje o GST-LKB1 catalíticamente inactivo [D194A] en el vector pEBG 2T (*Sapkota et al.*, 2001), FLAG-STRAD α , FLAG-STRAD β , myc-MO25 α , myc-MO25 β en el vector pCMV5 (ejemplo1; *Boudeau et al.*, 2003) o del dominio cinasa de AMPK α 1 [residuos 1-308] en el vector pGEX (*Scott et al.*, 2002) que ha sido descrito antes.

Cultivo de células, estimulación y lisis celular. La generación de células HeLa expresando establemente la tipo salvaje o la cinasa LKB1 ha sido descrita anteriormente (*Sapkota et al.*, @ 2002). Las células son cultivadas en medio mínimo esencial *Eagle* complementadas con 10% (v/v) tetraciclina libre de FBS, solución de aminoácido 1 X no esencial, la solución de penicilina/estreptomycin 1X (*Invitrogen*), 100 μ g/ml de zeocina y 5 μ g/ml de blasticidina (*Invitrogen*). La producción y el cultivo de LKB1^{+/+} inmortalizado y células de LKB1^{-/-} MEF de embriones de E9.5, fueron descritas anteriormente (ejemplo 2; *Hawley et al.*, 2003). Las células 293 embrionarias de riñón humano son cultivadas en medio *Eagle* modificado *Dulbecco* que contiene 10% de FBS. Las células cultivadas sobre una placa de diámetro 10 cm; en 10% (v/v) de suero no son alentadas, estimulada con 10 mM fenformina o 2mM de AICA ribosida por 1 h y lisadas en 1 ml de tampón de lisis en hielo después elevar rapido en PBS. Los lisados de célula de MEF rotas por congelación con nitrógeno líquido, se descongelan antes del uso y se centrifugaron 4°C durante 30 minutos a 23000 x g y se elimina el debris de célula. Los lisados de célula HeLa fueron centrifugados inmediatamente a 4°C durante 15 minutos a 13 000 rpm. Las concentraciones de proteína fueron determinadas por el método de Bradford con albúmina de suero bovino como patrón (*Bradford*, 1976).

Inmunotransferencia. Lisados de célula totales (10-50 μ g) o proteína inmunoprecipitada (mg de lisado de célula) fueron calentada en el tampón de muestra SDS, y sometido a SDS-PAGE y a electrotransferido a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas luego en 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl (TBS), 0,5% (por volumen) Tween contiene 10% (por masa) leche descremada, y monitoreada por 16 h en 4°C en TBS, 0,5% (por volumen) Tween, 5% (por masa) de leche descremada y 1 μ g/ml de los anticuerpos indicados. La detección de proteínas fue llevada a cabo usando peroxidasa y anticuerpos secundarios conjugados de *horse radish* y el reactivo quimiluminiscente mejorado (*Amersham Pharmacia Biotech*, Little Chalfont, U.K).

Expresión y purificación de cinasas relacionadas con AMPK en *E. coli*. Al menos lo demostrado por las demás, construcciones de pGEX que codifican para el tipo salvaje de longitud completa construcciones mutantes de GST-HA marcado con cinasas AMPK relacionada, ó GST-AMPK α 1 [1-308], fueron transformados en células *E. coli* BL21. Los cultivos de un litro fueron crecidos a 37°C en caldo Luria que contiene 100/de μ g/ml ampicillina hasta que la absorbancia a 600 nm fuera 0.8. Se añaden 100 μ M de Isopropil Galactosida, y las células fueron cultivadas por unas 16 horas adicionales a 26°C. Para las construcciones de pGEX que codifican el tipo salvaje o la mutante GST-HA-marcado QSK, la inducción de la expresión de la proteína es llevada cabo por cultivo de las células hasta que la absorbancia a 600 nm fuera de 1, y luego fue añadido 1 mM isopropil, D-galactosida y las células más adelante son cultivadas por 1 h a 30°C. Las células precipitadas son resuspendidas en 35 ml de tampón de lisis congelado y lisadas en un ciclo de congelación/descongelación, y los lisados fueron sonicados para fragmentar el ADN. Los lisados fueron centrifugados durante 30 minutos en 20,000 x g, y las proteínas recombinantes son purificadas por afinidad sobre *glutathion-Sepharose* y se eluye en tampón A conteniendo 20 mM de glutathion y 0,27 M sacarosa.

Expresión y purificación de cinasas relacionadas con AMPK en células 293. Veinte placas de diámetro 10 cm; de células 293 son cultivadas y cada placa transfectada con 5 μ g de la construcción pEBG-2T que codifica para la cinasa AMPK relacionada usando el método de fosfato de calcio modificado (*Amenosi et al.*, 1996). A las 36 horas de post-transfección, las células son rotas en 1 ml de tampón de Lisis helado, los lisados se centrifugan a 4°C durante 10

minutos en 13,000 x g. Las proteínas de fusión-GST fueron purificadas por cromatografía de afinidad sobre glutatión-*Sepharose* y eluida en tampón A conteniendo 20 mM de glutatión y 0,27 M de sacarosa.

Expresión y purificación del complejo LKB1: STRAD: MO25 en células 293. Combinaciones diferentes de GST-LKB1 marcado, FLAG - marcado STRAD α STRAD β , y Myc-marcado MO25 α o MO25 β son expresados en células 293 y los complejos purificados sobre glutatión-*Sepharose* como se describe anteriormente (Ejemplo 1; Boudeau *et al.*, 2003).

Medición de la activación de cinasas relacionadas con AMPK. Las subunidades catalítica de AMPK α 1 y cinasas AMPK relacionada son medidas luego de su fosforilación con LKB1 de la siguiente manera. 1-2 μ g de AMPK α 1 con el dominio catalítico o de cinasa AMPK relacionada, son incubados con ó sin 0,1-1 μ g del tipo salvaje del complejo de LKB1 indicado, en tampón A que contiene 5 mM de Acetato de magnesio y 0,1 mM de ATP, en un volumen final de 20 μ l. Después de la incubación a 30°C por las veces indicadas en la leyenda de la figura, el dominio catalítico de AMPK α 1 o actividad de cinasa AMPK relacionada fue determinada añadiendo 30 μ l de 5 mM de acetato de magnesio y 0,1 mM [γ -³²P]-ATP (300 cpm/pmol) y 200 μ M del péptido AMARA (AMARAASAAALARRR (*Dale et al.*, 1995)) como sustrato, después de la incubación durante 5-20 minutos a 30°C, la incorporación de fosfato ³²P dentro del péptido sustrato fue determinado poniendo la mezcla de reacción en papel de fósforocelulosa de P⁸¹ y contados por centelleo después de lavados los papeles con ácido fosfórico como se describe anteriormente (*Amenosi et al.*, 1995). Una unidad (U) de actividad se define como la que cataliza la incorporación de un nmol de ³²P en el sustrato. El tiempo en curso de las reacciones para la segunda etapa del ensayo se lleva a cabo para asegurar que la razón de fosforilación ocurra en línea recta con el tiempo. Los datos cinéticos fueron analizados de acuerdo con la relación *Michaelis-Menten* para una regresión no lineal usando programa de computadora PRISMA GraphPad (*GraphPad Software Inc, San Diego, USA*).

Mapeo de los sitios sobre BRSK2, NUA2 y MARK3 fosforilado por el complejo LKB1. El tipo salvaje y la mutante para las cinasas AMPK relacionada (5 μ g) fueron incubados por 30 minutos con 1-2 μ g de tipo salvaje LKB1:STRAD α : MO25 β en tampón A conteniendo 5 mM de acetato de magnesio y 100 μ M [γ -³²P]-ATP (5000 cpm/pmol) en un volumen de reacción total de 30 μ l. Después de 30 minutos, las reacciones fueron terminadas añadiendo SDS a una concentración final de 1% (w/v) y 10 mM ditiotritol y calentadas a 100°C durante 1 minuto. Después del enfriamiento, 4-vinilpiridina fue añadido a una concentración de 50 mM, y las muestras fueron dejadas en una plataforma agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente a residuos de cisteína alquilados y luego sometido a electroforesis sobre gel de 4-12% Bis-Tris poliacrilamida. Los geles estaban teñidos con Coomassie R250, autoradiografiados y las bandas que se corresponden con las cinasas AMPK relacionada fosforilada se cortan y dividen en partes más pequeñas. Existe un lavado siguiente durante 15 minutos sobre la plataforma agitada con 1 ml de lo siguiente: agua, una mezcla de agua 1: 1 y acetonitrilo, 0,1 M bicarbonato de amonio, una mezcla 1: 1 de 0,2 M bicarbonato de amonio y acetonitrilo y finalmente acetonitrilo. Las piezas de de gel son secadas por evaporación rotatoria e incubados en 0,1 ml de 50 mM bicarbonato de amonio 0,1% (por masa) n-octil-glucosida 1 μ g de tripsina alquilada. Después de 16 h, 0,1 ml de acetonitrilo es añadido y la mezcla se incuba sobre una plataforma agitada durante 10 minutos. El sobrenadante es retirado y las piezas de gel fueron lavadas más adelante durante 10 minutos en 0,3 ml de 50 mM bicarbonato de amonio, y 0,1% (v/v) ácido trifluoroacético Los sobrenadantes combinados, conteniendo > 90% de radiactividad ³²P, fueron cromatografiado sobre una columna C18 Vydac 218TP5215 (*Separations Group, Hesperia, CA*) equilibrado en 0.1% (por volumen) de ácido trifluoroacético en agua. La columna fue desarrollada con un gradiente lineal de acetonitrilo (la línea diagonal) en una velocidad de flujo de 0,2 ml/minutos y fracciones de 0,1 ml fueron colectados.

Análisis de secuenciación de fosfopéptidos. Fosfopéptidos aislados fueron analizados *Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyser* (MALDI-TOF-TOF) usando 5 mg/ml alfa ácido cianocinámico como matriz. Los espectros fueron adquiridos tanto en modo reflectron como lineales y la secuencia de fosfopéptidos potenciales fueron confirmada por MALDI-MS/MS sobre las masas seleccionadas. La pérdida de característica del ácido fosfórico (M-98 Da) fosfopéptido primario así como la pérdida neutral dehidroalanina (-69) para fosfoserina o ácido dehidroaminobutírico (-83) para fosfotreonina fue usado para asignar la posición del sitio de fosforilación (s). El sitio de fosforilación de todos los péptidos marcado por ³²P fue determinado por degradación de *Edman* fase sólida sobre un *Applied Biosystems 494A sequenator* el péptido acoplado a membrana *Sequelon AA* (Milligen) como se describe anteriormente (*Campbell y Morrice*, 2002).

Identificación del sitio de Fosforilación de lazo-T en MELK. El digestión de triptica de GST-MELK que había sido expresado y purificado de *E. coli* fue acidificado con 0,25 M de ácido acético en 30% acetonitrilo (v/v) y 2 μ l (volumen colocado) gel de quelato de hierro PHOS - selecto fue añadido (Sigma). La muestra fue agitada durante 30 minutos y la resina colectada *ZipTip* (Millipore) lavado con 2 x 25 μ l de 0,25 M de ácido acético con 30% acetonitrilo (v/v) y eluido con 25 μ l 0,4 M de NH₄OH. El eluato fue analizado por espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF y el fosfopéptido de lazo T es identificado y secuenciado por las ms/ms.

Inmunoprecipitación y ensayo de AMPK endógeno y cinasas relacionadas con AMPK

0,1-1 mg de proteína de lisados de Hela o de MEF fueron incubados a 4°C para 1 h sobre una plataforma agitada con 5 μ l de proteína G-*Sepharose* conjugada por 5 μ g de anticuerpo LKB1 humano. Los inmunoprecipitados fueron lavados dos veces con 1 ml de tampón de Lisis que contiene 0,5 M NaCl, y dos veces con 1 ml de tampón A. La actividad fosfotransferasa hacia el péptido AMARA fue luego medida en un volumen total de ensayo de 50 μ l como se describe arriba.

Inmunoprecipitación y ensayo de LKB1 endógeno empleando sustrato LKB1tido

Las proteínas de lisados de células Hela o MEF de 0,1-1 mg fue incubada en 4°C de por 1 h sobre una plataforma agitada con 5 µl de proteína *G-sepharose* conjugada con 5 µg de anticuerpo LKB1 humano. Los inmunoprecipitados fueron lavados dos veces con 1 ml de tampón de Lisis que contiene NaCl 0,5 M, y dos veces con 1 ml de tampón A.

La actividad fosfotransferasa hacia el péptido LKB1tido (residuos 241-260 de NUA2 humano LSNLYHQGK FLQTFGSGPLYRRR con 3 residuos de Arg adicionales se adicionan al C-terminal para permitir la unión al papel P81), esta es medida luego en un volumen total de ensayo de 50 µl que consiste de 50 mM de Tris/HCl pH 7,5, 0,1 mM EGTA, 0,1% (por volumen) 2-mercaptoetanol y 10 mM de acetato de magnesio, 0,1 mM [γ^{32} P]-ATP (~ 200 cpm/pmol) y 200 µM de péptido LKB1tido.. El ensayo es llevado a 30°C con agitación continua, para mantener los inmunoprecipitados en suspensión, y se culmina después de 10 minutos aplicando 40 µl de la mezcla de reacción en membranas p81. Las membranas p81 fueron lavadas en ácido fosfórico, y la radiactividad incorporada fue medida por conteo de centelleo como se describe para cinasa MAP (Amenosi *et al.*, 1995).

Referencias para la Sección de Materiales y Métodos

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B.A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 15, 6541-6551.

Alessi, D.R., Cohen, P., Ashworth, A., Cowley, S., Leever, S.J. and Marshall, C.J. (1995) Assay and expression of mitogen-activated protein kinase, MAP kinase kinase, and Raf. *Methods Enzymol*, 255, 279-290.

Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C. and Alessi, D.R. (2003) MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB 1 in the cytoplasm. *EMBO J*, 22, 5102-5114.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

Campbell, D.G. and Morrice, N.A. (2002) Identification of Protein Phosphorylation Sites by a Combination of Mass Spectrometry and Solid Phase Edman Sequencing. *J. Biomol. Technol.*, 13, 121-132.

Dale, S., Wilson, W.A., Edelman, A.M. and Hardie, D.G. (1995) Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett*, 361, 191-195.

Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Makela, T.P., Alessi, D.R. and Hardie, D.G. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADalpha/beta and MO25alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, 2, 28.

Sapkota, G.P., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., Goodarzi, A.A., Smythe, C., Shiloh, Y., Lees-Miller, S.P. and Alessi, D.R. (2002) Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochem J*, 368,507-516.

Sapkota, G.P., Kieloch, A., Lizcano, J.M., Lain, S., Arthur, J.S., Williams, M.R., Morrice, N., Deak, M. and Alessi, D.R. (2001) Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers Cancer Syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90RSK and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys433, is essential for LKB1 to suppress cell growth. *J Biol Chem*, 276, 19469-19482.

Scott, J.W., Norman, D.G., Hawley, S.A., Kontogiannis, L. and Hardie, D.G. (2002) Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *J Mol Biol*, 317, 309-323.

Sugden, C., Crawford, R.M., Halford, N.G. and Hardie, D.G. (1999) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J*, 19, 433-439.

Referencias

Alessi, D.R. (2001) Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. *Biochem Soc Trans*, 29, 1-14.

Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R. and Clevers, H.C. (2003) Activation of the tumour suppressor kinase LKB 1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J*, 22, 3062-3072.

- Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R. and DePinho, R.A. (2002) *Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. Nature*, 419, 162-167.
- 5 Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C. and Alessi, D.R. (2003a) *MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. EMBO J*, 22, 5102-5114.
- 10 Boudeau, J., Deak, M., Lawlor, M.A., Morrice, N.A. and Alessi, D.R. (2003b) Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochem J*, 370, 849-857.
- 15 Buchet-Poyau, K., Mehenni, H., Radhakrishna, U. and Antonarakis, S.E. (2002) Search for the second Peutz-Jeghers syndrome locus: exclusion of the STK13, PRKCG, KLK10, and PSCD2 genes on chromosome 19 and the STK11IP gene on chromosome 2. *Cytogenet Genome Res*, 97, 171-178.
- 20 Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A. and Hardie, D.G. (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*, 229, 558-565.
- 25 Dale, S., Wilson, W.A., Edelman, A.M. and Hardie, D.G. (1995) Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett*, 361, 191-195.
- 30 Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*, 89, 297-308.
- 35 Drewes, G. and Nurse, P. (2003) The protein kinase kin1, the fission yeast orthologue of mammalian MARK/PAR-1, localises to new cell ends after mitosis and is important for bipolar growth. *FEBS Lett*, 554, 45-49.
- 40 Feldman, J.D., Vician, L., Crispino, M., Hoe, W., Baudry, M. and Herschman, H.R. (2000) *The salt-inducible kinase, SIK, is induced by depolarization in brain. J Neurochem*, 74, 2227-2238.
- 45 Guo, S. and Kempthorne, K.J. (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81, 611-620.
- 50 Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D.A. and Hudson, E.R. (2003) *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. FEBS Lett*, 546, 113-120.
- 55 Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Makela, T.P., Alessi, D.R. and Hardie, D.G. (2003) *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADalpha/beta and MO25alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. J Biol*, 2, 28.
- 60 Hawley, S.A., Gadalla, A.E., Olsen, G.S. and Hardie, D.G. (2002) The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*, 51, 2420-2425.
- 65 Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P., Jarvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpaa, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olschwang, S., Olsen, A.S., Stratton, M.R., de la Chapelle, A. and Aaltonen, L.A. (1998) A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 391, 184-187.
- 70 Heyer, B.S., Kochanowski, H. and Solter, D. (1999) Expression of Melk, a new protein kinase, during early mouse development. *Dev Dyn*, 215, 344-351.
- 75 Heyer, B.S., Warsow, J., Solter, D., Knowles, B.B. and Ackerman, S.L. (1997) New member of the Snf1/AMPK kinase family, Melk, is expressed in the mouse egg and preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev*, 47, 148-156.
- 80 Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D. and Carlson, M. (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 8839-8843.
- 85 Horike, N., Takemori, H., Katoh, Y., Doi, J., Min, L., Asano, T., Sun, X.J., Yamamoto, H., Kasayama, S., Muraoka, M., Nonaka, Y. and Okamoto, M. (2003) Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2. *J Biol Chem*, 278, 18440-18447.
- 90 Jakobsen, S.N., Hardie, D.G., Morrice, N. and Tornqvist, H.E. (2001) 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J Biol Chem*, 276, 46912-46916.

Jenne, D.E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Muller, O., Back, W. and Zimmer, M. (1998) Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet*, 18, 38-43.

Jishage, K.I., Nezu, J.I., Kawase, Y., Iwata, T., Watanabe, M., Miyoshi, A., Ose, A., Habu, K., Kake, T., Kamada, N., Ueda, O., Kinoshita, M., Jenne, D.E., Shimane, M. and Suzuki, H. (2002) Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 8903-8908.

Johnson, L.N., Noble, M.E. and Owen, D.J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85, 149-158.

Kemp, B.E., Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Michell, B.J., Chen, Z.P. and Witters, L.A. (1999) Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci*, 24, 22-25.

Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G. and Cheng, N.S. (1988) Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 52, 311-320.

Lefebvre, D.L., Bai, Y., Shahmolky, N., Sharma, M., Poon, R., Drucker, D.J. and Rosen, C.F. (2001) Identification and characterization of a novel sucrose-non-fermenting protein kinase/AMP-activated protein kinase-related protein kinase, SNARK. *Biochem J*, 355, 297-305.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 1912-1934.

Martin, S.G. and St Johnston, D. (2003) A role for Drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature*, 421, 379-384.

Milburn, C.C., Boudeau, J., Deak, M., Alessi, D.R. and van aalten, D.M.F. (2003) Crystal structure of MO25a in complex with the C-terminus of the pseudokinase STE20-Related ADaptor (STRAD). *Nature Struct. Biol.*, In the press.

Miyoshi, H., Nakau, M., Ishikawa, T.O., Seldin, M.F., Oshima, M. and Taketo, M.M. (2002) Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice. *Cancer Res*, 62, 2261-2266.

Morton, D.G., Roos, J.M. and Kemphues, K.J. (1992) par-4, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Genetics*, 130, 771-790.

Nath, N., McCartney, R.R. and Schmidt, M.C. (2003) Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol Cell Biol*, 23, 3909-3917.

Ossipova, O., Bardeesy, N., DePinho, R.A. and Green, J.B. (2003) LKB 1 (XEEK1) regulates Wnt signalling in vertebrate development. *Nat Cell Biol*, 5, 889-894.

Peng, C.Y., Graves, P.R., Ogg, S., Thoma, R.S., Byrnes, M.J., 3rd, Wu, Z., Stephenson, M.T. and Piwnica-Worms, H. (1998) C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ*, 9, 197-208.

Resta, N., Stella, A., Susca, F.C., Di Giacomo, M., Forleo, G., Miccolis, I., Rossini, F.P., Genuardi, M., Piepoli, A., Grammatico, P. and Guanti, G. (2002) Two novel mutations and a new STK11/LKB1 gene isoform in Peutz-Jeghers patients. *Hum Mutat*, 20, 78-79.

Rossi, D.J., Ylikorkala, A., Korsisaari, N., Salovaara, R., Luukko, K., Launonen, V., Henkemeyer, M., Ristimäki, A., Aaltonen, L.A. and Makela, T.P. (2002) Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 12327-12332.

Sapkota, G.P., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., Goodarzi, A.A., Smythe, C., Shiloh, Y., Lees-Miller, S.P. and Alessi, D.R. (2002) Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochem J*, 368, 507-516.

Shulman, J.M., Benton, R. and St Johnston, D. (2000) The Drosophila homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell*, 101, 377-388.

Spicer, J., Rayter, S., Young, N., Elliott, R., Ashworth, A. and Smith, D. (2003) Regulation of the Wnt signaling component PAR1A by the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Oncogene*, 22, 4752-4756.

Sutherland, C.M., Hawley, S.A., McCartney, R.R., Leech, A., Stark, M.J., Schmidt, M.C. and Hardie, D.G. (2003) Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr Biol*, 13, 1299-1305.

- Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., Lu, J., Ogura, T. and Esumi, H. (2003a)** ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene*, 22, 6177-6182.
- 5 **Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., Lu, J., Ogura, T., Lavin, M.F. and Esumi, H. (2003b)** Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein. *J Biol Chem*, 278, 48-53.
- Takemori, H., Doi, J., Horike, N., Katoh, Y., Min, L., Lin, X.Z., Wang, Z.N., Muraoka, M. and Okamoto, M. (2003)** Salt-inducible kinase-mediated regulation of steroidogenesis at the early stage of ACTH-stimulation. *J Steroid*
10 *Biochem Mol Biol*, 85, 397-400.
- Tiainen, M., Vaahtomeri, K., Ylikorkala, A. and Makela, T.P. (2002)** Growth arrest by the LKB 1 tumor suppressor: induction of p21 (WAF1/CIP1). *Hum Mol Genet*, 11, 1497-1504.
- 15 **Tiainen, M., Ylikorkala, A. and Makela, T.P. (1999)** Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G₍₁₎ cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 9248-9251.
- Timm, T., Li, X.Y., Biernat, J., Jiao, J., Mandelkow, E., Vandekerckhove, J. and Mandelkow, E.M. (2003)** MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARKIPAR-1. *Embo J*, 22, 5090-5101.
- 20 **Tomancak, P., Piano, F., Riechmann, V., Gunsalus, K.C., Kempthues, K.J. and Ephrussi, A. (2000)** A Drosophila melanogaster homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat Cell Biol*, 2, 458-460.
- 25 **Wang, Z., Takemori, H., Halder, S.K., Nonaka, Y. and Okamoto, M. (1999)** Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. *FEBS Lett*, 453, 135-139.
- Watts, J.L., Morton, D.G., Bestman, J. and Kempthues, K.J. (2000)** The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development*, 127, 1467-1475.
- 30 **Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. (2003a)** LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Curr Biol*, 13, 2004-2008.
- 35 **Woods, A., Vertommen, D., Neumann, D., Turk, R., Bayliss, J., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D. and Rider, M.H. (2003b)** Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 278, 28434-28442.
- 40 **Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doeber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J. and Moller, D.E. (2001)** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108, 1167-1174.

Referencias citadas en la descripción

- 45 *Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- 50
- WO 0206520 A
 - US 4678751 A, Goeddel
 - WO 2004113562 A
 - US 4704362 A, Itakura
 - WO 0056864 A
 - US 4710463 A, Murray
 - US 4440859 A, Rutter
 - US 4757006 A, Toole, Jr.
 - US 4530901 A, Weissman
 - US 4766075 A, Goeddel
 - US 4582800 A, Crowl
 - US 4810648 A, Stalker
 - US 4677063 A, Mark
- 65

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- **BOUDEAU** *et al.* *FEBS Letters*, 2003, vol. 546, 159-165
- 5 • **HAWLEY** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 27879-87
- **LOCHHEAD** *et al.* 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes*, June 2000, vol. 49 (6), 896-903
- 10 • **YAMAUCHI** *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.*, November 2002, vol. 8 (11), 1288-95
- 15 • **WOODS** *et al.* Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol.*, September 2000, vol. 20 (18), 6704-11
- **ZHOU** *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.*, October 2001, vol. 108 (8), 1167-74
- 20 • **LECLERC** *et al.* Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, July 2001, vol. 50 (7), 1515-21
- **HABINOWSKI** *et al.* The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 07 September 2001, vol. 286 (5), 852-6
- 25 • **BAAS** *et al.* *EMBO J*, 2003, vol. 22 ((12)), 3062-3072
- **JOHNSON** *et al.* *Cell*, 1996, vol. 85, 149-158
- 30 • **TAYLOR; RADZIO-ANDZELM.** *Structure*, 1994, vol. 2, 345-355
- **PEARSON.** *Methods in Molecular Biology, Computer Analysis of Sequence Data. Humana Press*, 1994, vol. II, 365-389
- 35 • **HEYER** *et al.* Expression of Melk, a new protein kinase, during early mouse development. *Dev Dyn*, 1999, vol. 215, 344-351
- **HEYER** *et al.* New member of the Snf1/AMPK kinase family, Melk, is expressed in the mouse egg and preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev*, 1997, vol. 47, 148-156
- 40 • **XIA** *et al.* The new serine-threonine kinase, Qik, is a target of the Qin oncogene. *Biochem Biophys Res-Commun*, 2000, vol. 276, 564-570
- 45 • **COYLE** *et al.* Sam68 enhances the cytoplasmic utilization of intron-containing RNA and is functionally regulated by the nuclear kinase Sik/BRK. *Mol Cell Biol*, 2003, vol. 23, 92-103
- **DERRY** *et al.* Altered localization and activity of the intracellular tyrosine kinase BRK/Sik in prostate tumor cells. *Oncogene*, 2003, vol. 22, 4212-4220
- 50 • **DERRY** *et al.* Sik (BRK) phosphorylates Sam68 in the nucleus and negatively regulates its RNA binding ability. *Mol Cell Biol*, 2000, vol. 20, 6114-6126
- 55 • **FELDMAN** *et al.* The salt-inducible kinase, SIK, is induced by depolarization in brain. *J Neurochem*, 2000, vol. 74, 2227-2238
- **HORIKE** *et al.* Roles of several domains identified in the primary structure of salt-inducible kinase (SIK. *Endocr Res*, 2002, vol. 28, 291-294
- **LIN** *et al.* SIK (Salt-inducible kinase): regulation of ACTH-mediated steroidogenic gene expression and nuclear/cytosol redistribution. *Endocr Res*, 2000, vol. 26, 995-1002
- 60 • **LLOR** *et al.* BRK/Sik expression in the gastrointestinal tract and in colon tumors. *Clin Cancer Res*, 1999, vol. 5, 1767-1777
- 65 • **VASIOUKHIN; TYNER.** A role for the epithelial-cell-specific tyrosine kinase Sik during keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 14477-14482

ES 2 308 198 T3

- **WANG** *et al.* Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. *FEBS Lett*, 1999, vol. 453, 135-139
- **MANNING** *et al.* The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, vol. 298, 1912-1934
- **PENG** *et al.* *Cell Growth Differ*, 1998, vol. 9, 197-208
- **SPICER** *et al.* *Oncogene*, 2003, vol. 22, 4752-4756
- **SAMBROOK** *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- **SAIKI** *et al.* *Science*, 1988, vol. 239, 487-491
- **COHEN** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, vol. 69, 2110
- **SHERMAN** *et al.* Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, 1986
- **BEGGS**. *Nature*, 1978, vol. 275, 104-109
- **LUCHANSKY** *et al.* *Mol. Microbiol.*, 1988, vol. 2, 637-646
- **BECKER; GUARENTE**. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 194, 182
- **SOUTHERN**. *J. Mol. Biol.*, 1975, vol. 98, 503
- **BERENT** *et al.* *Biotech*, 1985, vol. 3, 208
- **MÉZIÈRE** *et al.* *J. Immunol.*, 1997, vol. 159, 3230-3237
- **H. ZOLA**. Monoclonal Antibodies: A manual of techniques. CRC Press, 1988
- **JGR HURRELL**. Monoclonal Hybridoma Antibodies: techniques and Applications. CRC Press, 1982
- **CORVALEN** *et al.* *Cancer Immunol. Immunother*, 1987, vol. 24, 127-132
- **CANCER IMMUNOL. IMMUNOTHER**, 133-137138-143
- **WINTER; MILSTEIN**. *Nature*, 1991, vol. 349, 293-299
- **ALESSI, D.R.; CAUDWELL, F.B.; ANDJELKOVIC, M.; HEMMINGS, B.A.; COHEN, P.** Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*, 1996, vol. 399, 333-338
- **ANDERSON, S.; DAVIE, D.N.; DAHLBÄCK, H.; JÖRNVALL, H.; RUSSELL, D.W.** Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome-P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile-acid D biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 8222-8229
- **HARLOW, E.; LANE, D.** Antibodies a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Publications, 1988
- **LIZCANO, J.M.; DEAK, M.; MORRICE, N.; ALESSI, D.R.** Identification of the residues of S6K, SGK and PKB that are phosphorylated by NEK6. Manuscript in Preparation, 2002
- **SANCHEZ, I.; HUGHES, R.T.; MAYER, B.J.; YEE, K.; WOODGETT, J.R.; AVRUCH, J.; KYRIAKIS, J.M.; ZON, L.I.** Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature*, 1994, vol. 372, 794-798
- **WAY, G.; MORRICE, N.; SMYTHE, C.; O'SULLIVAN, A.J.** Purification and identification of secernin, a novel cytosolic protein that regulates exocytosis in mast cells. *Mol Biol Cell*, 2002, vol. 13, 3344-3354
- **WOODS, Y.L.; RENA, G.; MORRICE, N.; BARTHEL, A.; BECKER, W.; GUO, S.; UNTERMAN, T.G.; COHEN, P.** The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 *in vitro*, a novel *in vivo* phosphorylation site. *Biochem J*, 2001, vol. 355, 597-607
- **BAAS, A.F.; BOUDEAU, J.; SAPKOTA, G.P.; SMIT, L.; MEDEMA, R.; MORRICE, N.A.; ALESSI, D.R.; CLEVERS, H.C.** Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like Pseudokinase STRAD. *EMBO J*, 2003, vol. 22 ((12)), 3062-3072

- **BARDEESY, N.; SINHA, M.; HEZEL, A.F.; SIGNORETTI, S.; HATHAWAY, N.A.; SHARPLESS, N.E.; LODA, M.; CARRASCO, D.R.; DEPINHO, R.A.** Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature*, 2002, vol. 419, 162-167
- 5 • **BIDLINGMAIER, S.; WEISS, E.L.; SEIDEL, C.; DRUBIN, D.G.; SNYDER, M.** The Cbklp pathway is important for polarized cell growth and cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2001, vol. 21, 2449-2462
- 10 • **BOUDEAU, J.; DEAK, M.; LAWLOR, M.A.; MORRICE, N.A.; ALESSI, D.R.** Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochem J*, 2003, vol. 370, 849-857
- 15 • **BOUDEAU, J.; KIELOCH, A.; ALESSI, D.R.; STELLA, A.; GUANTI, G.; RESTA, N.** Functional analysis of LKB1/STK11 mutants and two aberrant isoforms found in Peutz-Jeghers Syndrome patients. *Hum Mutat*, 2003, vol. 21, 172
- **BUCHET-POYAU, K.; MEHENNI, H.; RADHAKRISHNA, U.; ANTONARAKIS, S.E.** Search for the second Peutz-Jeghers syndrome locus: exclusion of the STK13, PRKCG, KLK10, and PSCD2 genes on chromosome 19 and the STK11IP gene on chromosome 2. *Cytogenet Genome Res*, 2002, vol. 97, 171-178
- 20 • **COLLINS, S.P.; REOMA, J.L.; GAMM, D.M.; UHLER, M.D.** LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated *in vivo*. *Biochem J*, 2000, vol. 345 (3), 673-680
- 25 • **DORLAND, S.; DEEGENAARS, M.L.; STILLMAN, D.J.** Roles for the *Saccharomyces cerevisiae* SDS3, CBK1 and HYM1 genes in transcriptional repression by SIN3. *Genetics*, 2000, vol. 154, 573-586
- **HEMMINKI, A.** The molecular basis and clinical aspects of Peutz-Jeghers syndrome. *Cell Mol Life Sci*, 1999, vol. 55, 735-750
- 30 • **HEMMINKI, A.; MARKIE, D.; TOMLINSON, I.; AVIZIENYTE, E.; ROTH, S.; LOUKOLA, A.; BIGNEL, G.; WARREN, W.; AMINOFF, M.; HOGLUND, P.** A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 1998, vol. 391, 184-187
- 35 • **JENNE, D.E.; REIMANN, H.; NEZU, J.; FRIEDEL, W.; LOFF, S.; JESCHKE, R.; MULLER, O.; BACK, W.; ZIMMER, M.** Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet*, 1998, vol. 18, 38-43
- 40 • **JISHAGE, K.I.; NEZU, J.I.; KAWASE, Y.; IWATA, T.; WATANABE, M.; MIYOSHI, A.; OSE, A.; HABU, K.; KAKE, T.; KAMADA, N.** Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 8903-8908
- **JOHNSTON, A.M.; NASELLI, G.; GONEZ, L.J.; MARTIN, R.M.; HARRISON, L.C.; DEAIZPURUA, H.J.** SPAK, a STE20/SPS1-related kinase that activates the p38 pathway. *Oncogene*, 2000, vol. 19, 4290-4297
- 45 • **JORGENSEN, P.; NELSON, B.; ROBINSON, M.D.; CHEN, Y.; ANDREWS, B.; TYERS, M.; BOONE, C.** High-Resolution Genetic Mapping With Ordered Arrays of *Saccharomyces cerevisiae* Deletion Mutants. *Genetics*, 2002, vol. 162, 1091-1099
- 50 • **KAROS, M.; FISCHER, R.** Molecular characterization of HymA, an evolutionarily highly conserved and highly expressed protein of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 1999, vol. 260, 510-521
- 55 • **KARUMAN, P.; GOZANI, O.; ODZE, R.D.; ZHOU, X.C.; ZHU, H.; SHAW, R.; BRIEN, T.P.; BOZZUTO, C.D.; OOI, D.; CANTLEY, L.C.** The Peutz-Jegher gene product LKB 1 is a mediator of p53-dependent cell death. *Mol Cell*, 2001, vol. 7, 1307-1319
- **MARIGNANI, P.A.; KANAI, F.; CARPENTER, C.L.** Lkb1 associates with brgl and is necessary for brgl-induced growth arrest. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 32415-32418
- 60 • **MARTIN, S.G.; ST JOHNSTON, D.** A role for *Drosophila* LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature*, 2003, vol. 421, 379-384
- **MIYAMOTO, H.; MATSUSHIRO, A.; NOZAKI, M.** Molecular cloning of a novel mRNA sequence expressed in cleavage stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 1993, vol. 34, 1-7
- 65 • **MIYOSHI, H.; NAKAU, M.; ISHIKAWA, T.O.; SELDIN, M.F.; OSHIMA, M.; TAKETO, M.M.** Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice. *Cancer Res*, 2002, vol. 62, 2261-2266

- **NAKAU, M; MIYOSHI, H; SELDIN, M.F; IMAMURA, M; OSHIMA, M; TAKETO, M.M.** Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in 1kb 1 gene knockout mice. *Cancer Res*, 2002, vol. 62, 4549-4553
- **NISHIGAKI, K; THOMPSON, D; YUGAWA, T; RULLI, K; HANSON, C; CMARIK, J.; GUTKIND, J.S; TERAMOTO, H; RUSCETTI, S.** Identification and characterization of a novel Ste-20/GCK-related kinase, PAP kinase (PAPK). *J Biol Chem.*, 2003
- **NOZAKI, M; ONISHI, Y; TOGASHI, S; MIYAMOTO, H.** Molecular characterization of the Drosophila Mo25 gene, which is conserved among Drosophila, mouse, and yeast. DNA. *Cell Biol*, 1996, vol. 15, 505-509
- **RESTA, N.; STELLA, A; SUSCA, F.C; DI GIACOMO, M; FORLEO, G; MICCOLIS, I; ROSSINI, F.P; GENUARDI, M; PIEPOLI, A; GRAMMATICO, P.** Two novel mutations and a new STK11/LKB1 gene isoform in Peutz-Jeghers patients. *Hum Mutat*, 2002, vol. 20, 78-79
- **ROSSI, D.J; YLIKORKALA, A; KORSISAARI, N; SALOVAARA, R; LUUKKO, K; LAUNONEN, V; HENKEMEYER, M; RISTIMAKI, A; AALTONEN, L.A; MAKELA, T.P.** Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 12327-12332
- **SANNA, M.G; DA SILVA CORREIA, J.; LUO, Y; CHUANG, B; PAULSON, L.M; NGUYEN, B; DEVE-RAUX, Q.L ; ULEVITCH, R.J.** ILPIP, a novel anti-apoptotic protein that enhances XIAP-mediated activation of JNK1 and protection against apoptosis. *J Biol Chem*, 2002, vol. 277, 30454-30462
- **SAPKOTA, G.P; BOUDEAU, J; DEAK, M; KIELOCH, A; MORRICE, N; ALESSI, D.R.** Identification and characterization of four novel phosphorylation sites (Ser31, Ser325, Thr336 and Thr366) on LKB1/STK11, the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome. *Biochem J*, 2002, vol. 362, 481-490
- **SAPKOTA, G.P; DEAK, M; KIELOCH, A; MORRICE, N; GOODARZI, A.A; SMYTHE, C; SHILOH, Y; LEES-MILLER, S.P; ALESSI, D.R.** Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK1 at Thr-366. *Biochem J*, 2002, vol. 368, 507-516
- **SAPKOTA, G.P; KIELOCH, A; LIZCANO, J.M; LAIN, S; ARTHUR, J.S; WILLIAMS, M.R; MORRICE, N; DEAK, M; ALESSI, D.R.** Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers Cancer Syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90RSK and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys433, is essential for LKB1 to suppress cell growth. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 19469-19482
- **SMITH, C.M; RADZIO-ANDZELM; E., MADHUSUDAN; AKAMINE, P; TAYLOR, S.S.** The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: prototype for an extended network of communication. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999, vol. 71, 313-341
- **SMITH, D.P; RAYTER, S.I; NIEDERLANDER, C; SPICER, J; JONES, C.M; ASHWORTH, A.** LIP1, a cytoplasmic protein functionally linked to the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Hum Mol Genet*, 2001, vol. 10, 2869-2877
- **SONGYANG, Z; FANNING, A.S; FU, C; XU, J; MARFATIA, S.M; CHISHTI, A.H; CROMPTON, A; CHAN, A.C; ANDERSON, J.M; CANTLEY, L.C.** Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*, 1997, vol. 275, 73-77
- **TAMARI, M; DAIGO, Y; AKAMURA, Y.** Isolation and characterization of a novel serine threonine kinase gene on chromosome 3p22-21.3. *J Hum Genet*, 1999, vol. 44, 116-120
- **TIAINEN, M; VAAHTOMERI, K; YLIKORKALA, A; MAKELA, T.P.** Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Hum Mol Genet*, 2002, vol. 11, 1497-1504
- **TIAINEN, M; YLIKORKALA, A; MAKELA, T.P.** Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, vol. 96, 9248-9251
- **WATTS, J.L; MORTON, D.G; BESTMAN, J; KEMPHUES, K.J.** The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development*, 2000, vol. 127, 1467-1475
- **YLIKORKALA, A; ROSSI, D.J; KORSISAARI, N; LUUKKO, K; ALITALO, K; HENKEMEYER, M; MAKELA, T.P.** Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice. *Science*, 2001, vol. 293, 1323-1326
- **YOO, L.I.; CHUNG, D.C; YUAN, J.** LKB1 A master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nat Rev Cancer*, 2002, vol. 2, 529-535
- **HARDIE, DG; SCOTT, JW; PAN, DA; HUDSON, ER.** Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*, 2003, vol. 546, 113-120

• **HARDIE, DG; HAWLEY, SA.** AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays*, 2001, vol. 23, 1112-1119

• **COVEN, DL; HU, X; CONG, L; BERGERON, R; SHULMAN, GI; HARDIE, DG; YOUNG, LH.** Physiologic role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003

• **HORMAN, S et al.** Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of Elongation Factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Current Biol.*, 2002, vol. 12, 1419-1423

• **KRAUSE, U; BERTRAND, L; HUE, L.** Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, 3751-3759

• **BOLSTER, DR; CROZIER, SJ; KIMBALL, SR; JEFFERSON, LS.** AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through downregulated mTOR signaling. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 23977-23980

• **MEISSE, D; VAN DE CASTEELE, M; BEAULOYE, C; HAINAULT, I; KEFAS, B; RIDER, M; FOUFELLE, F; HUE, L.** Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett*, 2002, vol. 526, 38-42

• **KEFAS, BA; CAI, Y; LING, Z; HEIMBERG, H; HUE, L; PIPELEERS, D; VAN DE CASTEELE, M.** AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun-N-terminal kinase. *J. Mol. Endocrinol*, 2003, vol. 30, 151-161

• **KEFAS, BA; HEIMBERG, H; VAULONT, S; MEISSE, D; HUE, L; PIPELEERS, D; VAN DE CASTEELE, M.** AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic beta cells through stimulation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*, 2003, vol. 46, 250-254

• **STEFANELLI, C; STANIC, I; BONAVIDA, F; LAMIGNI, F; PIGNATTI, C; GUARNIERI, C; CALDARERA, CM.** Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis with 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, vol. 243, 821-826

• **BLAZQUEZ, C; GEELLEN, MJ; VELASCO, G; GUZMAN, M.** The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. *FEBS Lett*, 2001, vol. 489, 149-153

• **WANG, W et al.** AMP-activated kinase regulates HuR subcellular localization. *Mol. Cell. Biol*, 2002, vol. 27, 3425-3436

• **IMAMURA, K; OGURA, T; KISHIMOTO, A; KAMINISHI, M; ESUMI, H.** Cell Cycle Regulation via p53 Phosphorylation by a 5'-AMP Activated Protein Kinase Activator, 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1-beta-d-Ribofuranoside, in a Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, vol. 287, 562-567

• **HAWLEY, SA; DAVISON, M; WOODS, A; DAVIES, SP; BERI, RK; CARLING, D; HARDIE, DG.** Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver, and identification of threonine-172 as the major site at which it phosphorylates and activates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 27879-27887

• **SUTHERLAND, CM; HAWLEY, SA; STARK, MJR; HARDIE, DG.** Identification of Elm1p as one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr. Biol*, 2003

• **NATH, N; MCCARTNEY, RR; SCHMIDT, MC.** Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Cell. Biol*, 2003, vol. 23, 3909-3917

• **HAWLEY, SA; SELBERT, MA; GOLDSTEIN, EG; EDELMAN, AM; CARLING, D; HARDIE, DG.** 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 27186-27191

• **HEMMINKI, A et al.** A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 1998, vol. 391, 184-187

• **JENNE, DE; REIMANN, H; NEZU, J; FRIEDEL, W; LOFF, S; JESCHKE, R; MULLER, O; BACK, W; ZIMMER, M.** Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat. Genet*, 1998, vol. 18, 38-43

- **HEMMINKI, A.** The molecular basis and clinical aspects of Peutz-Jeghers syndrome. *Cell. Mol. Life Sci*, 1999, vol. 55, 735-750
- **GIARDIELLO, FM; BRENSINGER, JD; TERSMETTE, AC; GOODMAN, SN; PETERSEN, GM; BOO-**
KER, SV; CRUZ-CORREA, M; OFFERHAUS, JA. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*, 2000, vol. 119, 1447-1453
- **BOUDEAU, J; SAPKOTA, G; ALESSI, DR.** LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. *FEBS Lett.*, 2003, vol. 546, 159-165
- **TIAINEN, M; YLIKORKALA, A; MAKELA, TP.** Growth suppression by LKB1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 9248-9251
- **TIAINEN, M; VAAHTOMERI, K; YLIKORKALA, A; MAKELA, TP.** Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Hum. Mol. Genet*, 2002, vol. 11, 1497-1504
- **JISHAGE, K et al.** Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 8903-8908
- **BARDEESY, N; SINHA, M; HEZEL, AF; SIGNORETTI, S; HATHAWAY, NA; SHARPLESS, NE; LODA, M; CARRASCO, DR; DEPINHO, RA.** Loss of the LKB1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature*, 2002, vol. 419, 162-167
- **MIYOSHI, H; NAKAU, M; ISHIKAWA, TO; SELDIN, MF; OSHIMA, M; TAKETO, MM.** Gastrointestinal hamartomatous polyposis in LKB1 heterozygous knockout mice. *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, 2261-2266
- **ROSSI, DJ et al.** Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 12327-12332
- **NAKAU, M; MIYOSHI, H; SELDIN, MF; IMAMURA, M; OSHIMA, M; TAKETO, MM.** Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in LKB1 gene knockout mice. *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, 4549-4553
- **BAAS, AF; BOUDEAU, J; SAPKOTA, GP; SMIT, L; MEDEMA, R; MORRICE, NA; ALESSI, DR; CLEVERS, HC.** Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J.*, 2003, vol. 22, 3062-3072
- **BOUDEAU, J; BAAS, AF; FDEAK, M; MORRICE, NA; KIELOCH, A; SCHUTOWSKI, M; PRESCOTT, AR; CLEVERS, HC; ALESSI, DR.** MO25 isoforms interact with the STE20-related pseudokinase STRAD α/β and enhance their ability to bind, activate and localise the LKB1 tumour suppressor in the cytoplasm. *EMBO J.*, 2003
- **CORTON, JM; GILLESPIE, JG; HAWLEY, SA; HARDIE, DG.** 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?. *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 229, 558-565
- **HAWLEY, SA; GADALLA, AE; OLSEN, GS; HARDIE, DG.** The anti-diabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*, 2002, vol. 51, 2420-2425
- **SAPKOTA, GP; DEAK, M; KIELOCH, A; MORRICE, N; GOODARZI, AA; SMYTHE, C; SHILOH, Y; LEES-MILLER, SP; ALESSI, DR.** Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochem. J.*, 2002, vol. 368, 507-516
- **COLLINS, SP; REOMA, JL; GAMM, DM; UHLER, MD.** LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated *in vivo*. *Biochem. J.*, 2000, vol. 345 (3), 673-680
- **SAPKOTA, GP; KIELOCH, A; LIZCANO, JM; LAIN, S; ARTHUR, JS; WILLIAMS, MR; MORRICE, N; DEAK, M; ALESSI, DR.** Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell growth. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 19469-19482
- **SAPKOTA, GP; BOUDEAU, J; DEAK, M; KIELOCH, A; MORRICE, N; ALESSI, DR.** Identification and characterization of four novel phosphorylation sites (Ser31, Ser325, Thr336 and Thr366) on LKB1/STK11, the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome. *Biochem. J.*, 2002, vol. 362, 481-490
- **BOUDEAU, J; DEAK, M; LAWLOR, MA; MORRICE, NA; ALESSI, DR.** Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochem. J.*, 2003, vol. 370, 849-857

• **ALESSI, DR.** Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001, vol. 29, 1-14

• **MANNING, G; WHYTE, DB; MARTINEZ, R; HUNTER, T; SUDARSANAM, S.** The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, vol. 298, 1912-1934

• **SUGDEN, C; DONAGHY, PG; HALFORD, NG; HARDIE, DG.** Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate HMG-CoA reductase, nitrate reductase and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiol.*, 1999, vol. 120, 257-274

• **WILSON, WA; HAWLEY, SA; HARDIE, DG.** The mechanism of glucose repression/derepression in yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Current Biol.*, 1996, vol. 6, 1426-1434

• **SCOTT, JW; NORMAN, DG; HAWLEY, SA; KONTOGIANNIS, L; HARDIE, DG.** Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *J. Mol. Biol.*, 2002, vol. 317, 309-323

• **WOODS, A; SALT, I; SCOTT, J; HARDIE, DG; CARLING, D.** The $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity *in vitro*. *FEBS Lett.*, 1996, vol. 397, 347-351

• **SUGDEN, C; CRAWFORD, RM; HALFORD, NG; HARDIE, DG.** Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.*, 1999, vol. 19, 1-7

• **HARDIE, DG; SALT, IP; DAVIES, SP.** Analysis of the role of the AMP-activated protein kinase in the response to cellular stress. *Methods Mol. Biol.*, 2000, vol. 99, 63-75

• **BRADFORD, MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, 248-254

• **DEVEREUX, J; HAEBERLI, P; SMITHIES, O.** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nuc. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 387-395

• **ALESSI, D.R; ANDJELKOVIC, M.; CAUDWELL, B; CRON, P; MORRICE, N; COHEN, P; HEMMINGS, B.A.** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*, 1996, vol. 15, 6541-6551

• **ALESSI, D.R; COHEN, P; ASHWORTH, A; COWLEY, S; LEEVERS, S.J; MARSHALL, C.J.** Assay and expression of mitogen-activated protein kinase, MAP kinase kinase, and Raf. *Methods Enzymol.*, 1995, vol. 255, 279-290

• **BOUDEAU, J; BAAS, A.F; DEAK, M; MORRICE, N.A; KIELOCH, A; SCHUTKOWSKI, M; PRESCOTT, A.R; CLEVERS, H.C; ALESSI, D.R.** MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB 1 in the cytoplasm. *EMBO J.*, 2003, vol. 22, 5102-5114

• **BRADFORD, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 1976, vol. 72, 248-254

• **CAMPBELL, D.G; MORRICE, N.A.** Identification of Protein Phosphorylation Sites by a Combination of Mass Spectrometry and Solid Phase Edman Sequencing. *J. Biomol. Techn.*, 2002, vol. 13, 121-132

• **DALE, S; WILSON, W.A; EDELMAN, A.M; HARDIE, D.G.** Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett.*, 1995, vol. 361, 191-195

• **HAWLEY, S.A; BOUDEAU, J; REID, J.L; MUSTARD, K.J; UDD, L; MAKELA, T.P; ALESSI, D.R; HARDIE, D.G.** Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADalpha/beta and MO25alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.*, 2003, vol. 2, 28

• **SAPKOTA, G.P; DEAK, M; KIELOCH, A; MORRICE, N; GOODARZI, A.A; SMYTHE, C; SHILOH, Y; LEES-MILLER, S.P; ALESSI, D.R.** Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochem J.*, 2002, vol. 368, 507-516

• **SCOTT, J.W; NORMAN, D.G; HAWLEY, S.A; KONTOGIANNIS, L; HARDIE, D.G.** Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *J Mol Biol.*, 2002, vol. 317, 309-323

- **SUGDEN, C; CRAWFORD, R.M; HALFORD, N.G; HARDIE, D.G.** Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J*, 1999, vol. 19, 433-439
- 5 • **ALESSI, D.R.** Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. *Biochem Soc Trans*, 2001, vol. 29, 1-14
- **BAAS, A.F; BOUDEAU, J; SAPKOTA, G.P; SMIT, L; MEDEMA, R.; MORRICE, N.A.; ALESSI, D.R; CLEVERS, H.C.** Activation of the tumour suppressor kinase LKB 1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J*, 2003, vol. 22, 3062-3072
- 10 • **BARDEESY, N; SINHA, M; HEZEL, A.F; SIGNORETTI, S; HATHAWAY, N.A; SHARPLESS, N.E.; LODA, M ; CARRASCO, D.R; DEPINHO, R.A.** Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature*, 2002, vol. 419, 162-167
- 15 • **BOUDEAU, J; BAAS, A.F; DEAK, M; MORRICE, N.A; KIELOCH, A; SCHUTKOWSKI, M; PRESCOTT, A.R; CLEVERS, H.C; ALESSI, D.R.** MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J*, 2003, vol. 22, 5102-5114
- 20 • **BOUDEAU, J; DEAK, M; LAWLOR, M.A; MORRICE, N.A; ALESSI, D.R.** Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochem J*, 2003, vol. 370, 849-857
- **BUCHET-POYAU, K; MEHENNI, H; RADHAKRISHNA, U; ANTONARAKIS, S.E.** Search for the second Peutz-Jeghers syndrome locus: exclusion of the STK13, PRKCG, KLK10, and PSCD2 genes on chromosome 19 and the STK11IP gene on chromosome 2. *Cytogenet Genome Res*, 2002, vol. 97, 171-178
- 25 • **CORTON, J.M; GILLESPIE, J.G; HAWLEY, S.A; HARDIE, D.G.** 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?. *Eur J Biochem*, 1995, vol. 229, 558-565
- 30 • **DREWES, G; EBNETH, A; PREUSS, U; MANDELKOW, E.M; MANDELKOW, E. MARK**, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*, 1997, vol. 89, 297-308
- 35 • **DREWES, G; NURSE, P.** The protein kinase kin1, the fission yeast orthologue of mammalian MARK/PAR-1, localises to new cell ends after mitosis and is important for bipolar growth. *FEBS Lett*, 2003, vol. 554, 45-49
- **FELDMAN, J.D; VICIAN, L; CRISPINO, M; HOE, W; BAUDRY, M; HERSCHMAN, H.R.** The salt-inducible kinase, SIK, is induced by depolarization in brain. *J Neurochem*, 2000, vol. 74, 2227-2238
- 40 • **GUO, S; KEMPHUES, K.J.** par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 1995, vol. 81, 611-620
- **HARDIE, D.G; SCOTT, J.W; PAN, D.A; HUDSON, E.R.** Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*, 2003, vol. 546, 113-120
- 45 • **HAWLEY, S.A; BOUDEAU, J; REID, J.L; MUSTARD, K.J; UDD, L; MAKELA, T.P; ALESSI, D.R; HARDIE, D.G.** Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADalpha/beta and MO25alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, 2003, vol. 2, 28
- 50 • **HAWLEY, S.A; GADALLA, A.E; OLSEN, G.S; HARDIE, D.G.** The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*, 2002, vol. 51, 2420-2425
- 55 • **HEMMINKI, A; MARKIE, D; TOMLINSON, I; AVIZIENYTE, E; ROTH, S; LOUKOLA, A; BIGNEL, G; WARREN, W; AMINOFF, M; HOGLUND, P.** A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 1998, vol. 391, 184-187
- **HEYER, B.S; KOCHANOWSKI, H; SOLTER, D.** Expression of Melk, a new protein kinase, during early mouse development. *Dev Dyn*, 1999, vol. 215, 344-351
- 60 • **HEYER, B.S; WARSOWE, J; SOLTER, D; KNOWLES, B.B; ACKERMAN, S.L.** New member of the Snf1/AMPK kinase family, Melk, is expressed in the mouse egg and preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev*, 1997, vol. 47, 148-156
- 65 • **HONG, S.P; LEIPER, F.C; WOODS, A; CARLING, D; CARLSON, M.** Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 8839-8843

- **HORIKE, N; TAKEMORI, H; KATOH, Y; DOI, J.; MIN, L; ASANO, T; SUN, X.J.; YAMAMOTO, H; KASAYAMA, S; MURAOKA, M.** Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2. *J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 18440-18447
- 5 • **JAKOBSEN, S.N; HARDIE, D.G; MORRICE, N; TORNQVIST, H.E.** 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 46912-46916
- 10 • **JISHAGE, K.I; NEZU, J.I; KAWASE, Y; IWATA, T; WATANABE, M; MIYOSHI, A; OSE, A; HABU, K.; KAKE, T; KAMADA, N.** Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 8903-8908
- 15 • **JOHNSON, L.N; NOBLE, M.E; OWEN, D.J.** Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 1996, vol. 85, 149-158
- 20 • **KEMP, B.E; MITCHELHILL, K.I; STAPLETON, D; MICHELL, B.J; CHEN, Z.P; WITTERS, L.A.** Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci*, 1999, vol. 24, 22-25
- 25 • **KEMPHUES, K.J; PRIESS, J.R; MORTON, D.G; CHENG, N.S.** Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 1988, vol. 52, 311-320
- 30 • **LEFEBVRE, D.L; BAI, Y; SHAHMOLKY, N; SHARMA, M; POON, R; DRUCKER, D.J.; ROSEN, C.F.** Identification and characterization of a novel sucrose-non-fermenting protein kinase/AMP-activated protein kinase-related protein kinase, SNARK. *Biochem J*, 2001, vol. 355, 297-305
- 35 • **MANNING, G; WHYTE, D.B; MARTINEZ, R; HUNTER, T; SUDARSANAM, S.** The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, vol. 298, 1912-1934
- 40 • **MILBURN, C.C.; BOUDEAU, J; DEAK, M; ALESSI, D.R; VAN AALTEN, D.M.F.** Crystal structure of MO25a in complex with the C-terminus of the pseudokinase STE20-Related ADaptor (STRAD). *Nature Struct. Biol*, 2003
- 45 • **MIYOSHI, H.; NAKAU, M; ISHIKAWA, T.O; SELDIN, M.F; OSHIMA, M; TAKETO, M.M.** Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice. *Cancer Res*, 2002, vol. 62, 2261-2266
- 50 • **MORTON, D.G; ROOS, J.M; KEMPHUES, K.J.** par-4, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Genetics*, 1992, vol. 130, 771-790
- 55 • **NATH, N; MCCARTNEY, R.R; SCHMIDT, M.C.** Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol Cell Biol*, 2003, vol. 23, 3909-3917
- 60 • **OSSIPOVA, O.; BARDEESY, N; DEPINHO, R.A; GREEN, J.B.** LKB 1 (XEEK1) regulates Wnt signalling in vertebrate development. *Nat Cell Biol*, 2003, vol. 5, 889-894
- 65 • **PENG, C.Y; GRAVES, P.R; OGG, S; THOMA, R.S; BYRNES, M.J; WU, Z; STEPHENSON, M.T; PIWNICA-WORMS, H.** C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ*, 1998, vol. 9, 197-208
- 70 • **RESTA, N.; STELLA, A; SUSCA, F.C; DI GIACOMO, M; FORLEO, G; MICCOLIS, I; ROSSINI, F.P; GENUARDI, M; PIEPOLI, A; GRAMMATICO, P.** Two novel mutations and a new STK11/LKB1 gene isoform in Peutz-Jeghers patients. *Hum Mutat*, 2002, vol. 20, 78-79
- 75 • **ROSSI, D.J; YLIKORKALA, A; KORSISAARI, N; SALOVAARA, R.; LUUKKO, K; LAUNONEN, V; HENKEMEYER, M; RISTIMAKI, A; AALTONEN, L.A; MAKELA, T.P.** Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 12327-12332
- 80 • **SAPKOTA, G.P; DEAK, M.; KIELOCH, A; MORRICE, N; GOODARZI, A.A; SMYTHE, C; SHILOH, Y; LEES-MILLER, S.P; ALESSI, D.R.** Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochem J*, 2002, vol. 368, 507-516
- 85 • **SHULMAN, J.M; BENTON, R; ST JOHNSTON, D.** The Drosophila homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell*, 2000, vol. 101, 377-388
- 90 • **SPICER, J.; RAYTER, S; YOUNG, N; ELLIOTT, R; ASHWORTH, A; SMITH, D.** Regulation of the Wnt signalling component PAR1A by the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Oncogene*, 2003, vol. 22, 4752-4756

- SUTHERLAND, C.M; HAWLEY, S.A; MCCARTNEY, R.R; LEECH, A; STARK, M.J; SCHMIDT, M.C; HARDIE, D.G. Elmlp is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr Biol*, 2003, vol. 13, 1299-1305
- 5 • SUZUKI, A; KUSAKAI, G; KISHIMOTO, A; LU, J.; OGURA, T; ESUMI, H. ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene*, 2003, vol. 22, 6177-6182
- 10 • SUZUKI, A; KUSAKAI, G; KISHIMOTO, A; LU, J; OGURA, T; LAVIN, M.F; ESUMI, H. Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein. *J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 48-53
- 15 • TAKEMORI, H; DOI, J.; HORIKE, N.; KATOH, Y; MIN, L; LIN, X.Z; WANG, Z.N; MURAOKA, M.; OKAMOTO, M. Salt-inducible kinase-mediated regulation of steroidogenesis at the early stage of ACTH-stimulation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, vol. 85, 397-400
- 20 • TIAINEN, M; VAAHTOMERI, K; YLIKORKALA, A; MAKELA, T.P. Growth arrest by the LKB 1 tumor suppressor: induction of p21 (WAF1/CIP1). *Hum Mol Genet*, 2002, vol. 11, 1497-1504
- TIAINEN, M; YLIKORKALA, A; MAKELA, T.P. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, vol. 96, 9248-9251
- 25 • TIMM, T; LI, X.Y; BIERNAT, J; JIAO, J; MANDELKOW, E; VANDEKERCKHOVE, J; MANDELKOW, E.M. ARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARKIPAR-1. *Embo J*, 2003, vol. 22, 5090-5101
- 30 • TOMANCAK, P; PIANO, F; RIECHMANN, V; GUNSALUS, K.C; KEMPHUES, K.J; EPHRUSSI, A. A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat Cell Biol*, 2000, vol. 2, 458-460
- 35 • WANG, Z; TAKEMORI, H; HALDER, S.K; NONAKA, Y; OKAMOTO, M. Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. *FEBS Lett*, 1999, vol. 453, 135-139
- WATTS, J.L; MORTON, D.G; BESTMAN, J; KEMPHUES, K.J. The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development*, 2000, vol. 127, 1467-1475
- 40 • WOODS, A; JOHNSTONE, S.R; DICKERSON, K; LEIPER, F.C; FRYER, L.G; NEUMANN, D; SCHLATTNER, U; WALLIMANN, T; CARLSON, M; CARLING, D. LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Curr Biol*, 2003, vol. 13, 2004-2008
- 45 • WOODS, A; VERTOMMEN, D; NEUMANN, D; TURK, R; BAYLISS, J; SCHLATTNER, U; WALLIMANN, T; CARLING, D; RIDER, M.H. Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 28434-28442
- 50 • ZHOU, G; MYERS, R; LI, Y; CHEN, Y; SHEN, X; FENYK-MELODY, J; WU, M; VENTRE, J; DOEBBER, T; FUJII, N. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 2001, vol. 108, 1167-1174.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación de un compuesto para su uso en la modulación, por ejemplo la promoción, la activación o la fosforilación de AMPK (proteína cinasa activada con AMP) o miembro de la subfamilia AMPK en una célula, método que comprende los pasos de:

(1) determinación si un compuesto de prueba modula, por ejemplo promueve, la actividad de proteína cinasa de LKB1, y

(2) selección de un compuesto que modula, por ejemplo promueve, la actividad de la proteína cinasa de LKB1, en el que el LKB1 está en una preparación con STRAD y MO25 en el que el MO25 es recombinante y esta expresado de un ácido nucleico recombinante.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el LKB1 ó STRAD es recombinante y se expresa de un ácido nucleico recombinante.

3. Una célula capaz de expresar LKB1, STRAD, y sobre expresado o expresado por MO25 recombinante desde un ácido nucleico recombinante.

4. La célula de la reivindicación 3 que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica para MO25.

5. La célula de las reivindicaciones 3 ó 4 que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica para LKB1.

6. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica para STRAD.

7. Una célula que comprende LKB1, STRAD y la sobre expresión ó expresión por MO25 recombinante de un ácido nucleico recombinante.

8. Una célula de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende LKB1 recombinante expresado de un ácido nucleico recombinante.

9. Una célula de acuerdo con las reivindicaciones 7 ó 8 que consta de STRAD recombinante expresado de un ácido nucleico recombinante.

10. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 9, en la que la célula es una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a la 6.

11. Un método para hacer las preparaciones que comprenden LKB1, STRAD y MO25 recombinante expresados de un ácido nucleico recombinante que comprende el paso de purificación del preparado de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 10.

12. El método de la reivindicación 11 en el que la preparación comprende LKB1 recombinante expresado en un ácido nucleico recombinante.

13. El método de las reivindicaciones 11 ó 12 en el que la preparación comprende STRAD recombinante expresado de un ácido nucleico recombinante.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a la 13, en el que las proporciones de LKB1: STRAD: MO25 en las preparaciones son 1: 1: 1.

15. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que LKB1 está en una preparación obtenida u obtenible por el método de una cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a la 14, ó en una célula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones de la 3 a la 10.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, 11 a la 15, en el que la preparación comprende un complejo que consta de LKB1, STRAD y MO25.

17. Un método para identificar un compuesto para modular la actividad celular de LKB1, el método comprende los pasos de (1) determinación si un compuesto de prueba modula la actividad de la proteína cinasa LKB 1 de una preparación o complejo obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a 14 ó 16, ó en una célula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a la 10 y (2) seleccionar un compuesto que modula dicha actividad de proteína cinasa LKB1.

18. El método de la reivindicación 1 ó de la reivindicación 17, en el que la actividad de proteína cinasa LKB1 es medida usando AMPK o un miembro de la subfamilia AMPK o un fragmento de ella, como el sustrato.

19. Un conjunto de partes que consta de LKB1 o un polinucleotido recombinante que codifica para LKB1, STRAD, o un polinucleotido recombinante que codifica para STRAD, y un polinucleotido recombinante que codifica para M025.

5 20. Un conjunto de partes que comprende (1) AMPK o un miembro de la subfamilia AMPK, o un polinucleotido recombinante que codifica para AMPK o miembro de la subfamilia AMPK o un fragmento de ella y (2) un conjunto de partes como se define en la reivindicación 19 o de una célula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones de 3 a la 10.

10 21. Un método para la preparación de un complejo de LKB1/STRAD/M025 que comprende los pasos de (1) seleccionar un tipo de célula en la cuál se sobre expresa LKB1, que comprende el paso de determinación si el tipo de célula es una que expresa STRAD y M025 (2) preparar dun complejo LKB1/STRAD/M025 por la sobre expresión de LKB1 en el tipo de célula seleccionada.

15 22. Un método para la preparación de un complejo LKB1/STRAD/M025 que comprende los pasos (1) sobre expresión de LKB1 en una célula usando un método de acuerdo con la reivindicación 21, y (2) preparación de dicho complejo desde la célula.

20 23. Un método para identificación de una diferencia genética asociada con PJS (síndrome de Peutz-Jeghers) que consta de los pasos de (1) investigación de la secuencia de un gen que codifica para una isoforma M025 en al menos un paciente que tiene PJS (2) identificación de cualquier diferencia entre la secuencia de dicho paciente y la secuencia equivalente de un individuo sin PJS.

25 24. Un método para identificación de un compuesto, el cual activa AMPK o un miembro de la subfamilia AMPK por un mecanismo semejante a una metformina ó fenformina o AICA ribosido, en el que el efecto de un compuesto de prueba sobre la activación de AMPK o miembro de la subfamilia de AMPK por una preparación o complejo que se obtiene por el método de una cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a 14 ó 16, o una célula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones de la 3 a 10 se compara con el efecto de metformina ó fenforminas, ó AICA ribosida sobre la activación de AMPK o uno de los miembro subfamilia de AMPK y un compuesto con un efecto semejante al que se selecciona.

30 25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 18 ó 24, o un conjunto de partes de la reivindicación 20, en el que el miembro de la subfamilia AMPK es o comprende un polipéptido AMPK α 1 ó AMPK α 2.

35 26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 18 ó 24, o un conjunto de partes de la reivindicación 20, en el que el miembro de la subfamilia AMPK es o comprende un polipéptido NUAK1, NUAK2, BRSK1, BRSK2, SIK, QIK, QSK, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4 o MELK.

40

45

50

55

60

65

Figura 1

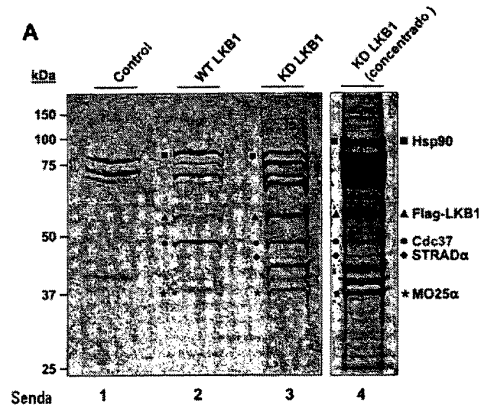


Figura 1a

B

	Nombre de la proteína	Coincidencia péptido	% cobertura secuencias	Numero NCBI gi
■	Hsp90	15/44	30%	20149594
▲	Flag-LKB1	14/46	35%	7106425
●	Cdc37	31/72	59%	5901922
◆	STRADα	11/80	34%	12060855
★	MO25α	17/37	47%	7706481

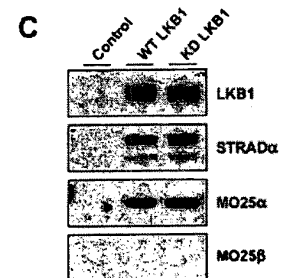


Figura 2

A

hMO25α	1	MPF-PFGKSHKSPADYVKNLKESSAFLERQD-----ISDKRAEKATEEVSQKILVA
hMO25β	1	MPL--FSKSHVNPAAEVVKILKINLAELEHQ-----DKKTEKASEEVSQKILVA
dMO25	1	MPL--FGKSQKSPVEVVKSLKBAINALFAG-----DRAVEKAOEIVSKILVVS
cMO25α	1	VLKPLPGHSDQPADYVKNLKESSAFLERQD-----TNTSEHVEKATEEVSQKILVA
cMO25β	1	MPL-LFGKSHKSPADYVKNLKESSAFLERQD-----ISDKRAEKATEEVSQKILVA
hMO25α	50	KKKMLYGH--NEKEP-OTBAVAOLAQELYSGLLSTLADQLIDFEGKIDVACIFNNEL
hMO25β	46	KKKMLYGH--NEKEP-PTBAVAOLAQELYSGLLSTLADQLIDFEGKIDVACIFNNEL
dMO25	46	KKKMLYGH--SEAEFPADYVVAOLAQELYSGLLSTLADQLIDFEGKIDVACIFNNEL
cMO25α	53	AKTFEYGSDADEPHN---EQTQLAQEYVYNELPMLIKHMLPEFECKIKDVASEFNNEL
cMO25β	60	IKGSFYVNDSSAPSEKHVVQVAOLAQELYSGLLSTLADQLIDFEGKIDVACIFNNEL
hMO25α	107	RRQIGTRSPTEVEYICTOONILEMLIKGYE--SPETALNCGTMLRECIRHEPLAKITILNS
hMO25β	103	RRQIGTRSPTEVEYISAPHEMLIKGYE--AQQIALRCQMLRECIRHEPLAKITILNS
dMO25	104	RRQIGTRSPTEVEYICTPEILLTILGAYEDAPHEIALNSQTMRECIRHEPLAKITILNS
cMO25α	110	RRQIGTRSPTEVEYIAAPHEILLTILGVE--QPHIALTCCSMLRECIRHEPLAKITILNS
cMO25β	120	RRQIGTRSPTEVEYICAPHEILLTILGVE--VPHIALTCCSMLRECIRHEPLAKITILNS
hMO25α	165	QNRDFFVVEVSTFDIASDAFTFKDLLTRHKLVAEFLKQHYDRFF-SEVQNLNSEN
hMO25β	161	QNRDFFVVEVSTFDIASDAFTFKDLLTRHKLVAEFLKQHYDRFF-EDVQNLNSEN
dMO25	164	EFKRFVVEVSTFDIASDAFTFKDLLTRHKLVAEFLKQHYDRFF-SQVQNLNSEN
cMO25α	168	YQRFVVEVSTFDIASDAFTFKDLLTRHKLVAEFLKQHYDRFF-GQVQNLNSEN
cMO25β	176	VEHTFELVVEVSTFDIASDAFTFKDLLTRHKLVAEFLKQHYDRFF-AQVQNLNSEN
hMO25α	224	VTRQSLKLLGELLDRHNFTMTKYISKPENLKLMMNLLRDKSRNICFEAFHVFKVFA
hMO25β	220	VTRQSLKLLGELLDRHNFTMTKYISKPENLKLMMNLLRDKSRNICFEAFHVFKVFA
dMO25	224	VTRQSLKLLGELLDRHNFTMTKYISKPENLKLMMNLLRDKSRNICFEAFHVFKVFA
cMO25α	227	VTRQSLKLLGELLDRHNFTMTKYISKPENLKLMMNLLRDKSRNICFEAFHVFKVFA
cMO25β	237	VTRQSLKLLGELLDRHNFTMTKYISKPENLKLMMNLLRDKSRNICFEAFHVFKVFA
hMO25α	284	NPNKPTPTDILLNCKLVEFLSSQNDRTDEQFNDEKAYLIKQIKELNPAQQA--
hMO25β	280	SNPKPTPTDILLNCKLVEFLSSQNDRTDEQFNDEKAYLIKQIKELNPAQQA--
dMO25	284	NPNKPTPTDILLNCKLVEFLSSQNDRTDEQFNDEKAYLIKQIKELNPAQQA--
cMO25α	287	NPNKPTPTDILLNCKLVEFLSSQNDRTDEQFNDEKAYLIKQIKELNPAQQA--
cMO25β	297	NPNKPTPTDILLNCKLVEFLSSQNDRTDEQFNDEKAYLIKQIKELNPAQQA--
hMO25α		-----
hMO25β		-----
dMO25		-----
cMO25α		-----
cMO25β	357	KSKEDENQEPAGPSEGPSTSQ

Figura 2a

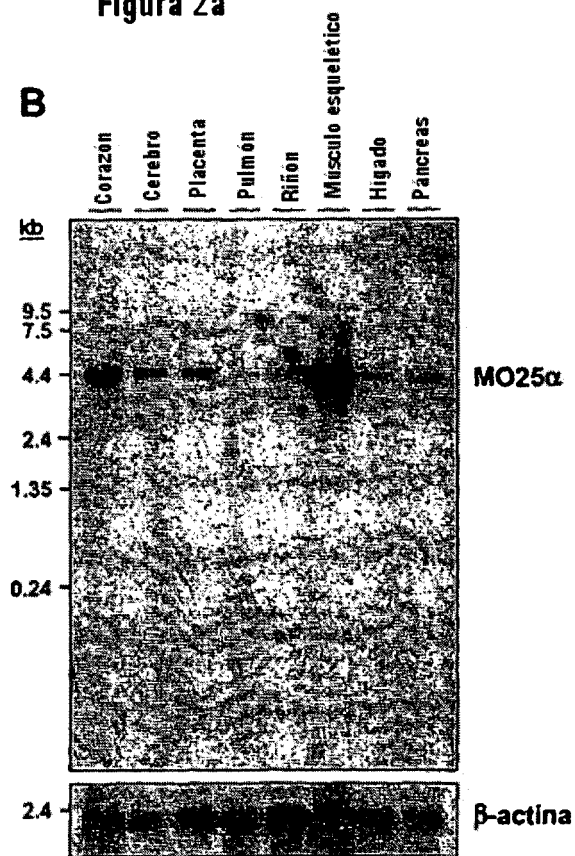


Figura 2b

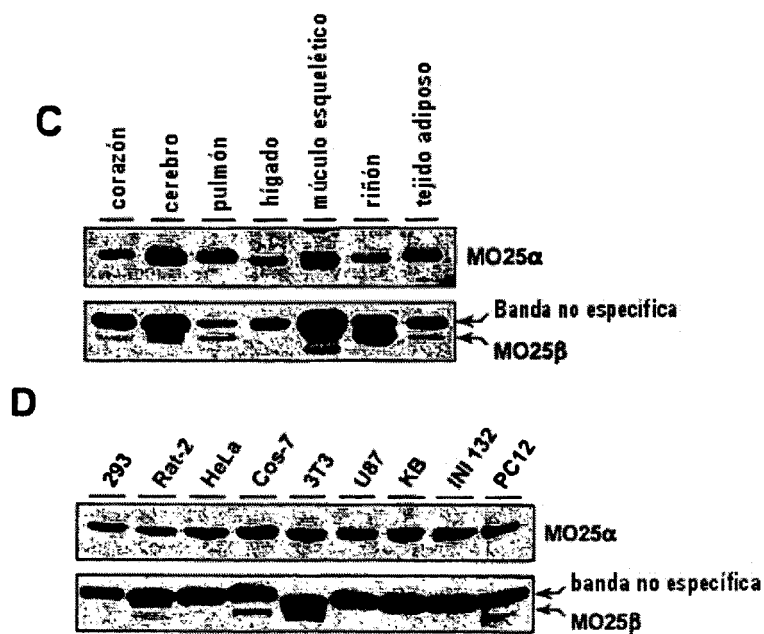


Figura 3

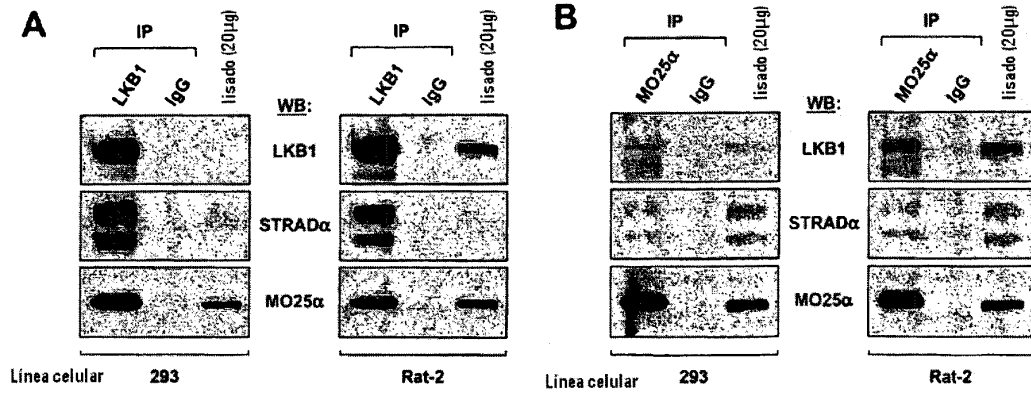


Figura 4

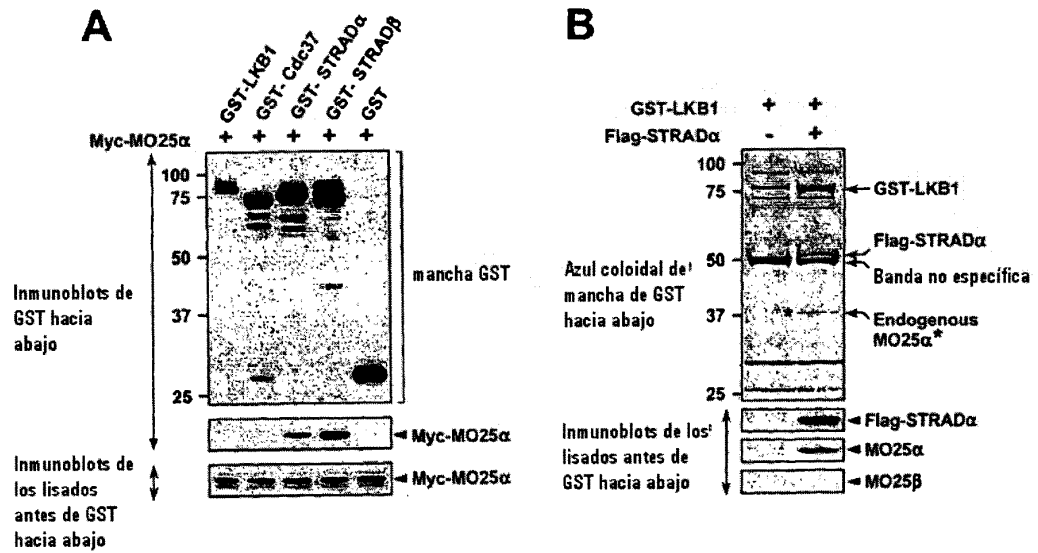


Figura 4a

C

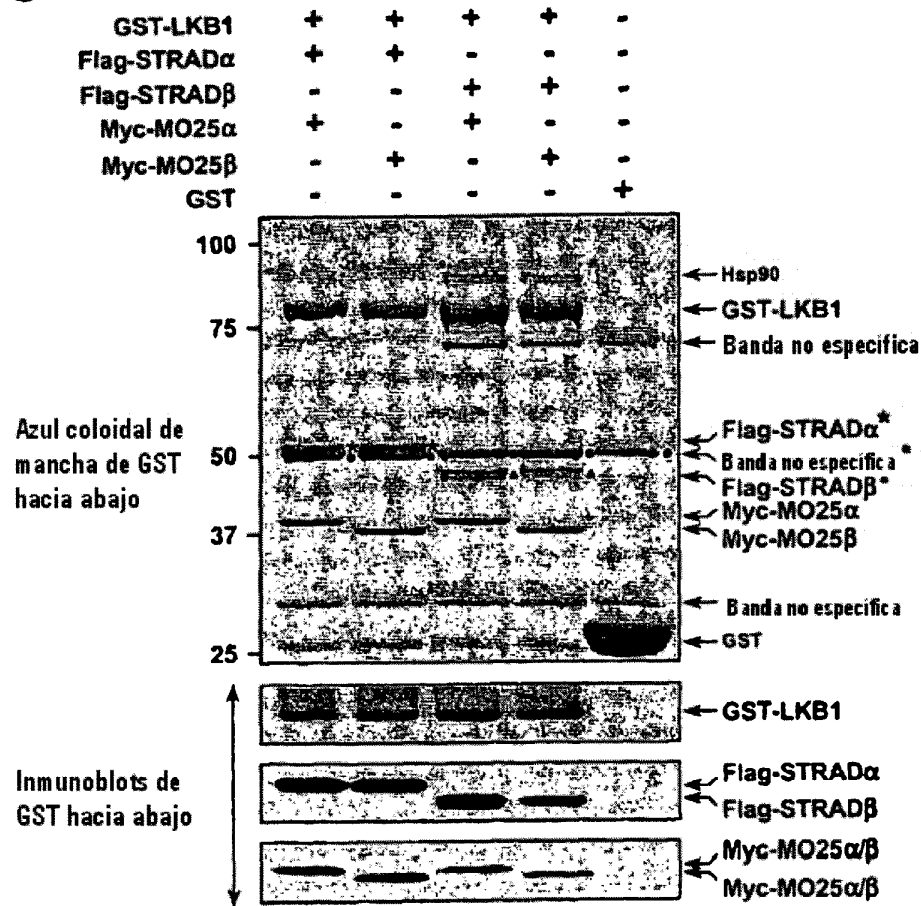


Figura 5

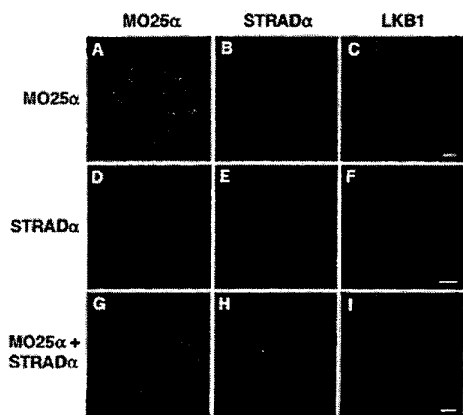


Figura 5a

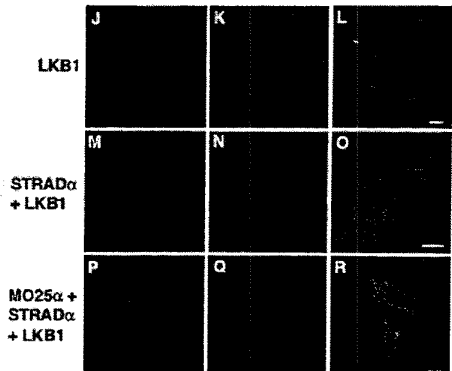


Figura 6

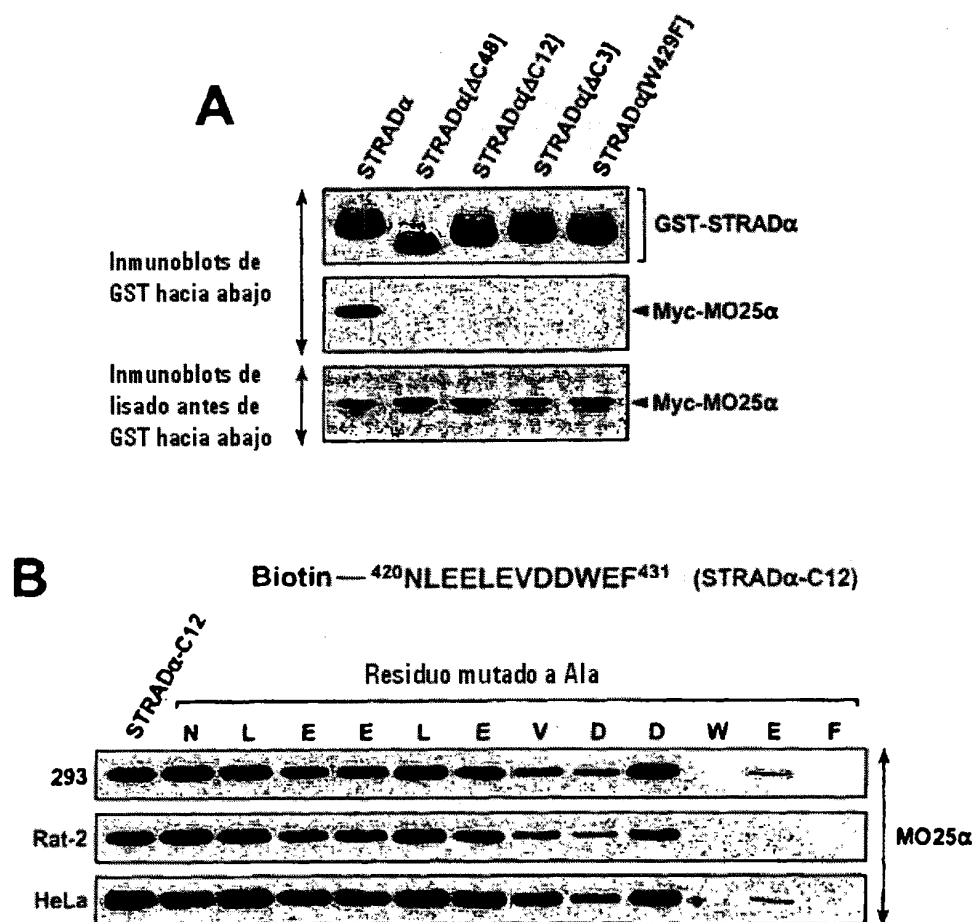


Figura 6a

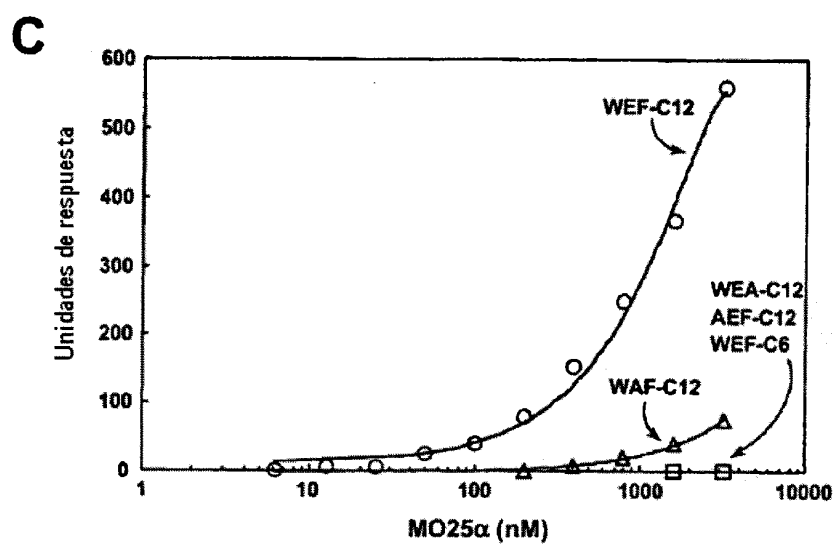


Figura 7

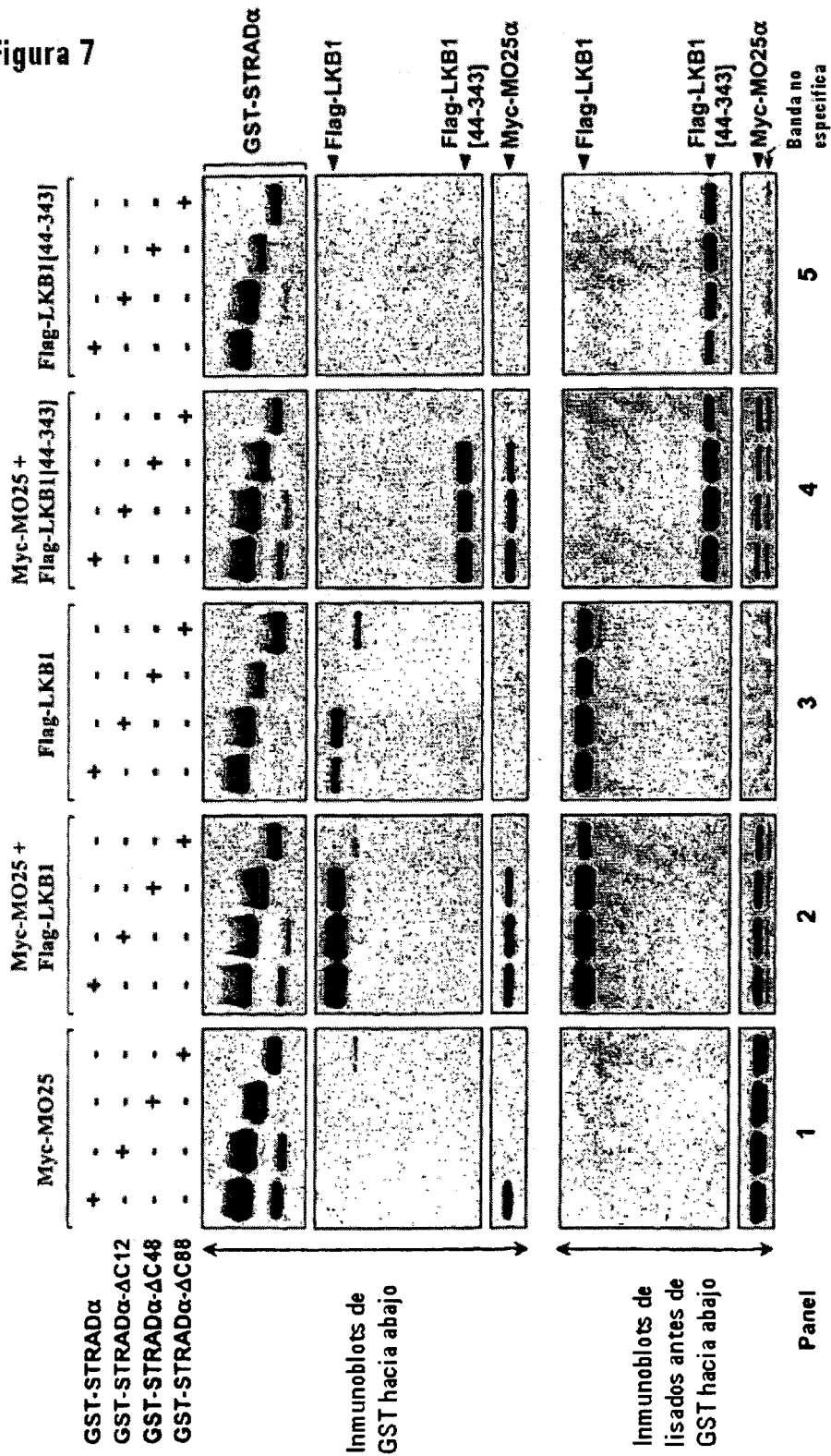
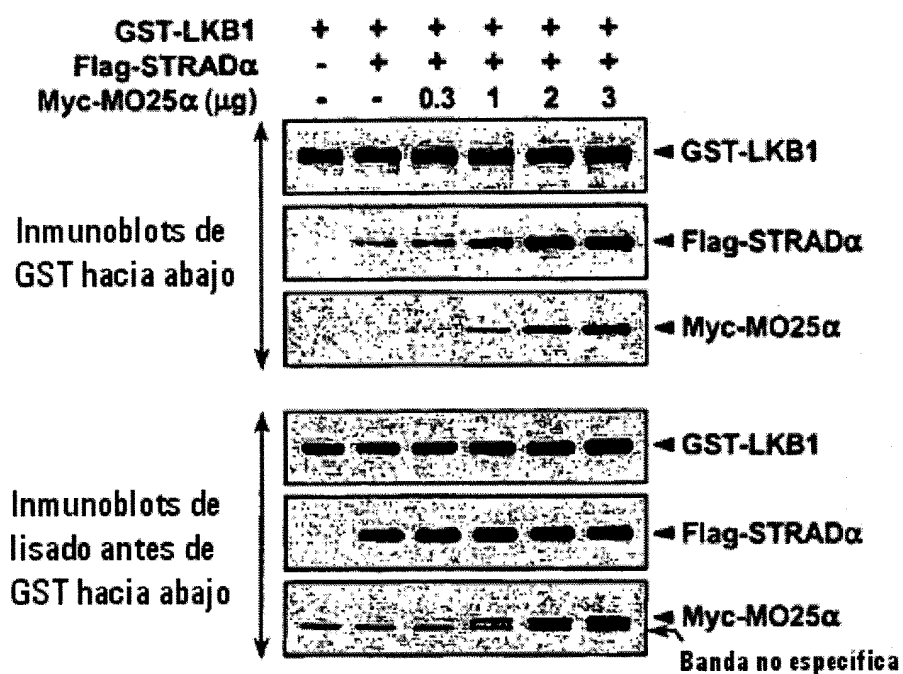


Figura 8

A



B

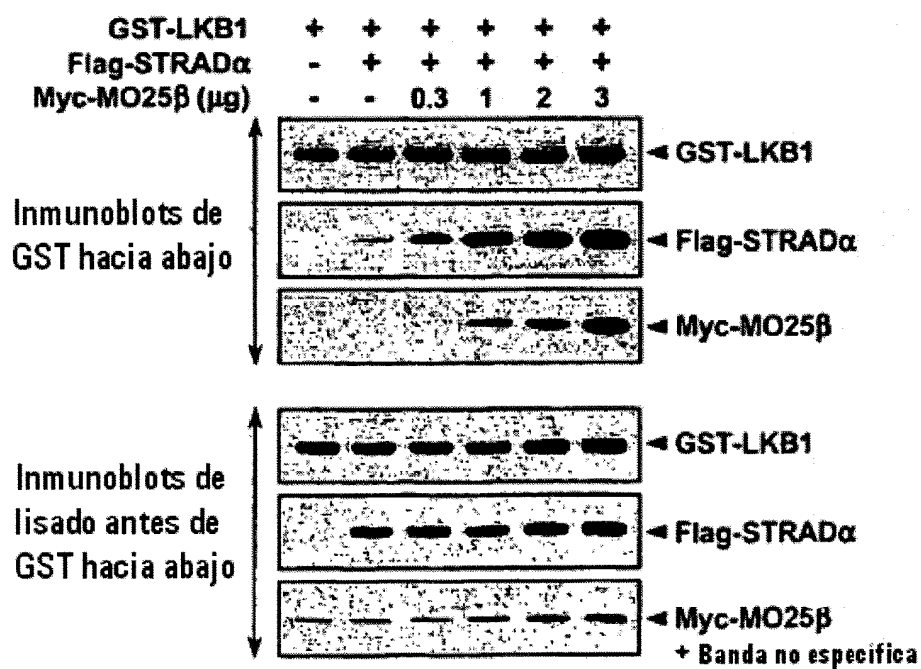


Figura 9

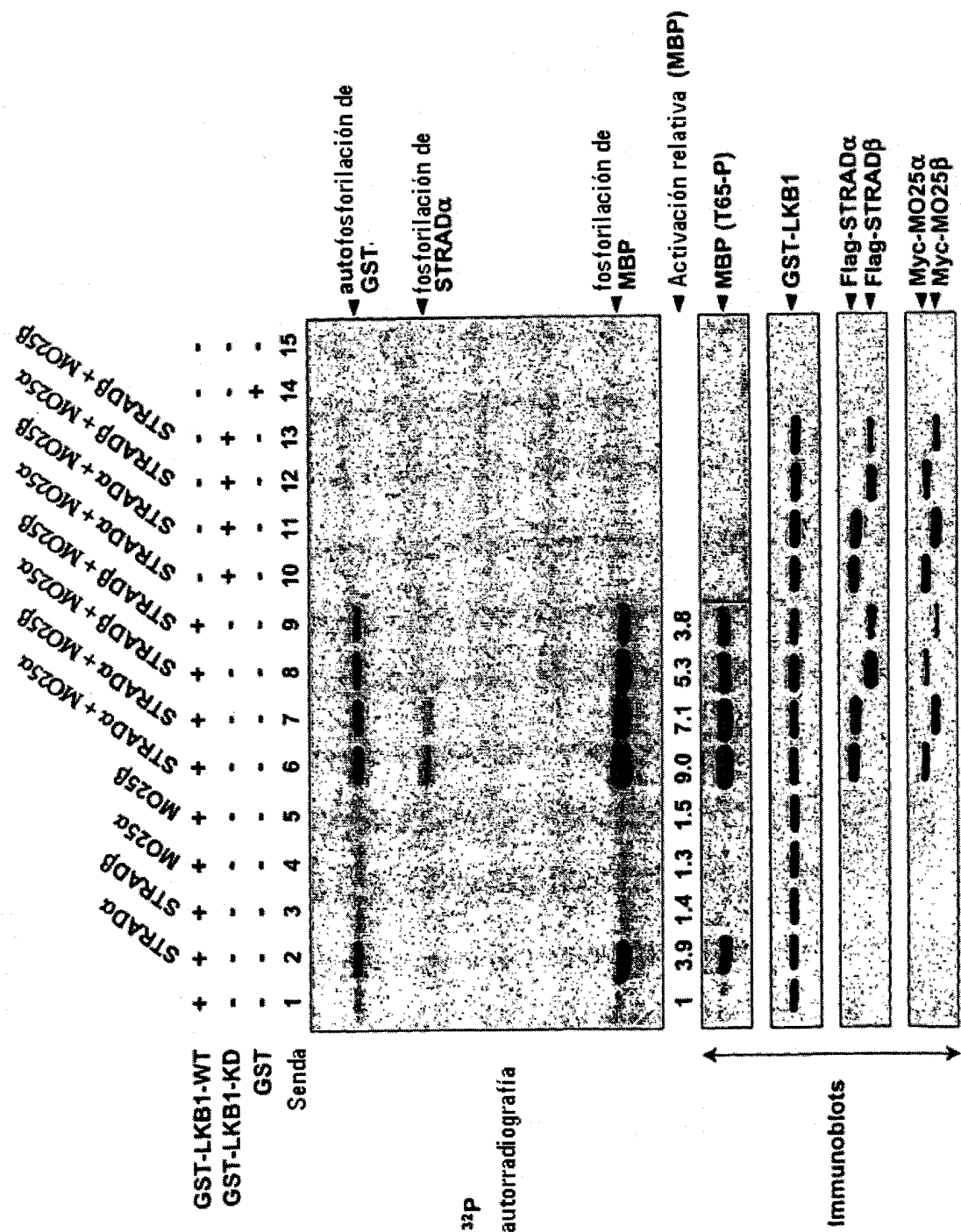


Figura 10

hSTRAD α	1	MSFLVSKIERRRVSEMPIVEGLRDELEFGEPPPGDTRKKTNDASPESTIASFSKQEVMS
hSTRAD β	1	-----MSLDDCCCTSTQVESLRPEK-----GSESTIYOYLVEPILSWSRSTRASBV
hSPAK	1	-----MAEPSSGSPVHVLPQCAAPVTAAAAAPAAAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAV
hOSR1	1	-----MAEPSSGSPVHVLPQCAAPVTAAAAAPAAAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAV
hSTRAD α	61	SELPEGGCYELLTVIGKGFEDLMTVMUARNKPTGEVTVVRINLEACSNEVTFQGELEH
hSTRAD β	50	LCSTNVSHYELQVEIGRGFFNLTSVHLARHTPTGTLVTITITNLNQCNEERLKAQKANI
hSPAK	57	GMPTCRDAYELOEVIGSG--ATAVVOAALCKPCQERVAIKRINLEKCTSMDELLK-EIQ
hOSR1	9	PWSINRDDYELQEVIGSG--ATAVVOAALCKPCQERVAIKRINLEKCTSMDELLK-EIQ
hSTRAD α	121	VSKLFNHPNIVPVRAFFADNELMWTSTFAYGSAKDEHCTHFMD-----INELATAY
hSTRAD β	110	LSHFFRHPNITVTVTPVGSWLMATSPFAYGSAKDEHCTHFMD-----INELATAY
hSPAK	114	AMSQCCHPNIVTYTTSFVVKDELWVMKLSGGSMLEHITKYVNRGEHNGVLEERLAT
hOSR1	66	AMSQCCHPNIVTYTTSFVVKDELWVMKLSGGSMLEHITKYVNRGEHNGVLEERLAT
hSTRAD α	175	ILQGVLEGLDYLVHNGQIHRDVKAGNILLGEGDGSVQADPFVSAPLATGGDITR--NKVR
hSTRAD β	164	ILFGAVRGLVYLHNGQIHRDVKAGNILLGEGDGSVQADPFVSAPLATGGDITR--NKVR
hSPAK	174	ILQGVLEGLDYLVHNGQIHRDVKAGNILLGEGDGSVQADPFVSAPLATGGDITR--NKVR
hOSR1	126	ILQGVLEGLDYLVHNGQIHRDVKAGNILLGEGDGSVQADPFVSAPLATGGDITR--NKVR
hSTRAD α	235	KYSKVLPMESPEVEQNLQGYDANSDIMSVGITACELANCHVPEEDMELATONLEKLEIG
hSTRAD β	224	QFSTSVQPMESPEVEQNLQGYDANSDIMSVGITACELANCHVPEEDMELATONLEKLEIG
hSPAK	232	KTFVGTTCMMAPVMEQ--VRGYDFKADMSFGITATLATGAAPTHKYPMPKMLMLTTON
hOSR1	184	KTFVGTTCMMAPVMEQ--VRGYDFKADMSFGITATLATGAAPTHKYPMPKMLMLTTON
hSTRAD α	295	---TTP-----ELL-ETSTIPAEELTSPSRSVANSGL-SDSL
hSTRAD β	284	---PPYSP-----ELL-ETSTIPAEELTSPSRSVANSGL-SDSL
hSPAK	291	DPPTLETGVDEKEMKKYKGSFRKMSLCLQKDPKRPAAELHCKKFKAKNKR--ENLQ
hOSR1	243	DPPTLETGVDEKEMKKYKGSFRKMSLCLQKDPKRPAAELHCKKFKAKNKR--ENLQ
hSTRAD α	328	TTSTFPSPSGCWPEHPYHRT--PFPFHFVBOQLQNPAPPSATLLNHSFKTIKER
hSTRAD β	318	VSSGTHVNSRLHTPSSRT--PFPFHFVBOQLQNPAPPSATLLNHSFKTIKER
hSPAK	350	EKLLETRTPHACRAKKVRRVPCSSGGLHKTEGCDWENSDDMDKSEEGRAAHSCKKSE
hOSR1	302	EKLLETRTPHACRAKKVRRVPCSSGGLHKTEGCDWENSDDMDKSEEGRAAHSCKKSE
hSTRAD α	386	ASK-----APPELRP-----VTPITNF
hSTRAD β	376	SCD-----SLSLAP-----PFL
hSPAK	410	VKE--EAPPEAVSAS-----HPEQ--QS-----ESMHSQGPANEDY
hOSR1	362	VKESISNSEFPPTDTPVGTLLQPECHSAHLQPAPQIATQPTQNSLPPEAPKATACNL
hSTRAD α	404	EGSQ--S-----QDHSQFGVTVNLEDEVDDEE-----
hSTRAD β	389	NKPSIS--S-----LPVLPWTEPECDFDEKDSVMEF-----
hSPAK	447	REAS--S-----CAVNLVLRNRSKELNDIRFEETPGRTADGVSOELISAGLVDCRDNI
hOSR1	422	SSGSGSOETKIPHSVLVLRNRSKELNDIRFEETPGRTADGVSOELISAGLVDCRDNI
hSTRAD α		-----
hSTRAD β		-----
hSPAK	502	VAANLOKIVDEPKALNTLTFKLASGGGSEIPDEVKLIGFAQLS
hOSR1	482	VAANLOKIVEPQSNRENTFKLASGVGGSEIPDEVKLIGFAQLS

Figura 11

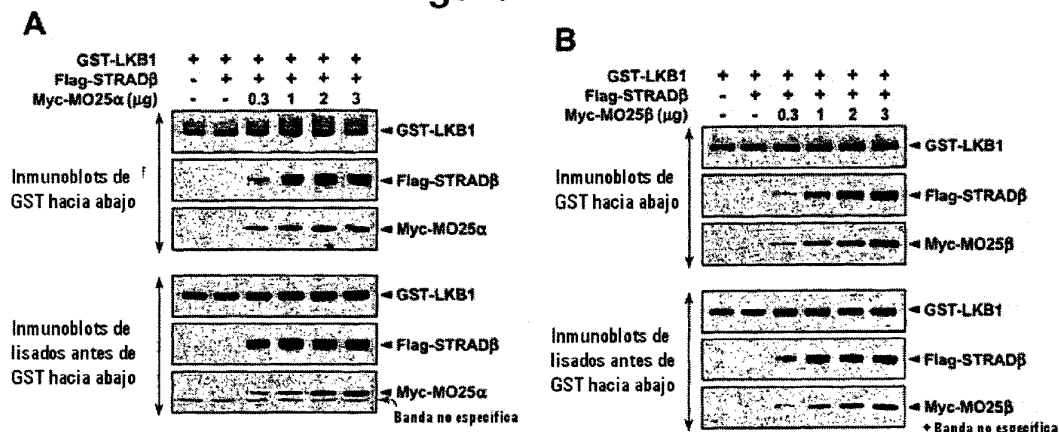


Figura 12

Tos3	11	..LPRSSLLYNNASNSSSRIKETRKVKLLYNPLTKR.....Q...ILNNFEILATLGNGQ
Pak1	94	..TPTTSSFCSSGSSKNKVETNRISLTYPVSKR.....K...VLNTYEIIKELGHGQ
CamKK β	121	CICPSLPYSPVSSPQSSPRLPRPTVESHHVSITGM.....QDCVQLNQYTLKDEIGKGS
LKB1	7	QQLGMFTEGELMSVGMDFIHRIDSTEVYQP..RR.....KRAKLGKYLMDLLGEGS
Elm1	39	TSSFGSSFSQOKPTYSTIIGENIHTILDEIRPYVKKITVSDQDKKTINQYTLGVSAGSGQ
consensus	121	p s s s s s rik t v l y pltkr q ilnny i lG Gq
Tos3	61	YGKVKLARDLGTGALVAIKILNRFKRS....GYSL.....QLKV.EN.....
Pak1	144	HGKVKLARDILSKQLVAIKIVDRHEKKQRKFFTFIK.....SSKISEN.....
CamKK β	176	YGVVKLAYNENDNTYYAMKVLK..KKLIRQAGFPR.....RPPPRGTRPAPGGCIQP
LKB1	60	YGKVKVLOSETLCRAVKILKK..KKLRR.....I
Elm1	99	FGYVRKAYSSTLGKVVAVKIIIPKPPWNAQQYSVNQVMRQIQLWKSCKGKITTNMSGNEAMR
consensus	181	yGkVkla d t lVAiKil k kk k y k
Tos3	99	PRVQIEIEVMKRCHHE.NVVELYEILNDPESTKVYLVLVEYCSRGPVKWCPEKNMEI
Pak1	187	DKIKREIAIMKKCHHK.HVQVQLIEVLDDLKSRKIYLVLEYCSRGVEKWCPPDCMES
CamKK β	227	RGPIEQVYQEIAILKKLDHP.NVVKLVEVLDDPNEDHLYMVFEVLNQGPV.....MEV
LKB1	89	PNGEANVKKEIQLLRRLRHK.NVIQLVDVLYNEEKQKMYMVEYC.....VCGMQEM.L
Elm1	159	LMNIEKCRWEIFAASRLRNHVHRLIECLDSPFSESIWIVTNWCSLGELQWRDDEDI
consensus	241	drvK EI vmkrlhh nvv LlievLddp s kvylVleycs g v wc mei
Tos3	154	.KAVGPSILTFOQ....SRKVVLDDVSGLEYLHSGGITHRDIKPSNLLISSNGTV.KISD
Pak1	242	.DAKGPSILSFQE....TREILRGVVLGLEYLHYQGIHRDIKPANLLISGDGTV.KISD
CamKK β	279	.PTLKP..LSEDQ....ARFYFDLIKIEYLHYQKIIHRDIKPSNLLVGEDGHI.KIAD
LKB1	141	.DSVPEKRFPVCQ....AHGYFCQLIDGLEYLHSGGIVHKDIKPGNLLLTGGTL.KISD
Elm1	219	LPQWKKIVISNCSVSTFAKKILEDMTKGLEYLHSGGCIHRDIKPSNILLDEEEKVAKLSD
consensus	301	v p ils q ar vv dvv GLEYLHsQgiiHrDIKPSnllis dgtv KisD
Tos3	208	FG..VAM.STATGSTNIQSSHEQLKSRALGTPAFFAPELCSTEKEY.....
Pak1	296	FG..VSLAASSTNSSDSSSLELELAKTVGTPAFFAPEMCLGEDAFTRYNLTKENLFRG
CamKK β	331	FG..V.....SNEFKGS..DALLSNTVGTPAFMAPELS.....ETRKIFSG
LKB1	195	LG..VAEALHPFAADTCRTSQ.....GSPAFQPPETIANGLDTFE.....
Elm1	279	FGSCIFTFQSLPFSDFANFEDCFQRELNKIVGTPAFIAPELCHLGNSKRDFVTD.....
consensus	361	fG v t s d s l r vGtPAF aPElc y
Tos3	252	SC.SSAIDIWSLGVTIYCLLFGKLPFNANSGLFLFDSIINKPLEFPSYEMLNGATSGIT
Pak1	354	SCISFMIDIWAVGVTLYCLLFGMLPFFSDFELKLFKIVNDPLKFPTFEKIQSNKVS
CamKK β	369	K....ALDVWAMGVTLYCFVFGQCFPMDERIMCLHLSKIKSQALEFPDQPDIA.....
LKB1	233	...GFKVDIWSAGVTLYNITTGLYPFEGDNIYKLFENIGKGSYAIP.....
Elm1	332	...GFKLDIWSLGVTIYCLLYNELPFFGENEFETYHKIIEVSLSSKINGNTLNDLVIKRL
consensus	421	f iDiWslGVtlycllfg lPF ad l lfdki l fp em
Tos3	311	M.EEYT...DAKDLLKKLLQKDPDKRIKLADIKVHPFMC.....HYGKSDAASVL...TN
Pak1	414	CEEEYE...MAKDLLKLLLEKNPQKRMTPAIKKHPFVS.WDFDHVPENDEKLLS...SV
CamKK β	417	E...DLKDLITRMLDKNPESRIVVPEIKLHPVTRHGAELPSEDENCTLVEVTE
LKB1	276	.GDCGP...PLSDLLKGMLEYEPAKRFSIRQIROHSWFRK...KHPPAEAPVPIPPSPDT
Elm1	389	LEKDVTLRISIQDLVKVLSRDQPIDSRNHSQISSSS.VNPVRNEGVPVRRFFGRLLTKKGK
consensus	481	ee lkDLlkkllleknP kri l Ik hpfv dh p d vl t
Tos3	359	LETFHELKVSPP.....SSCKRVELVSLPVNSSFASLDSVYMFNDHNNLRTGADRNS
Pak1	467	LE..QKLRF.....QCNQTDQFE.PISISKHELKNAV.....SGVGKKIKESV
CamKK β	469	EEVENSVKHIPSLATVILVKTMIRKRSFGNPFEGSRREERSLSAPGNLLTKQSGEDNLQ
LKB1	329	KDRWRSMTVVPLYEDLHGADEDEDLFDIEDDIYTDQFTVPGQVPEEEASHNGQRRGLPK
Elm1	448	KKTSKGKDKVLVSATSQVTPSIHIDEEDPKECFSTTVLRSSPDSSDYCSSLGEEAIQVT
consensus	541	e lk p l rve pv s lks s lg

Figura 13

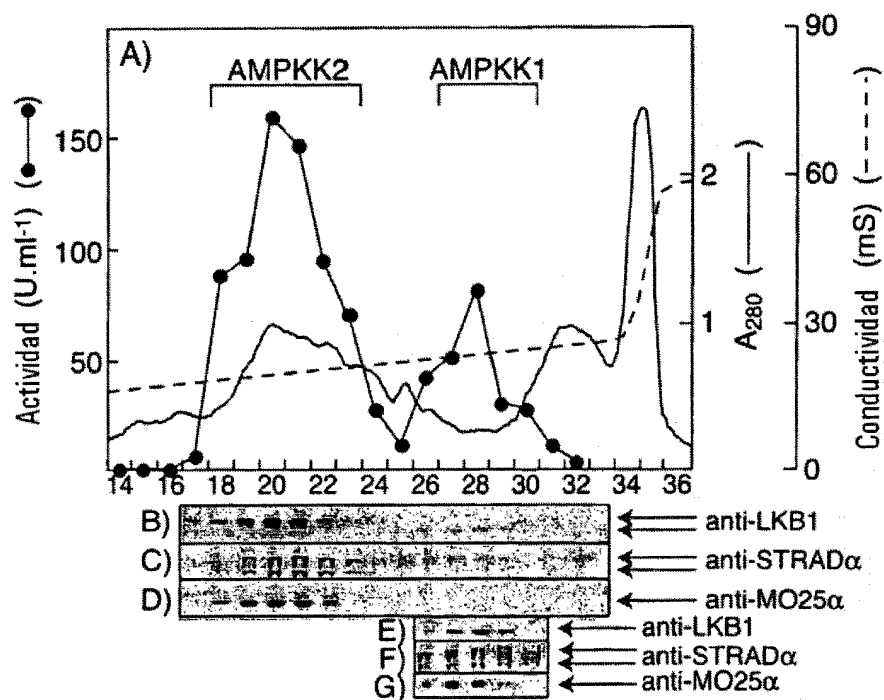


Figura 14

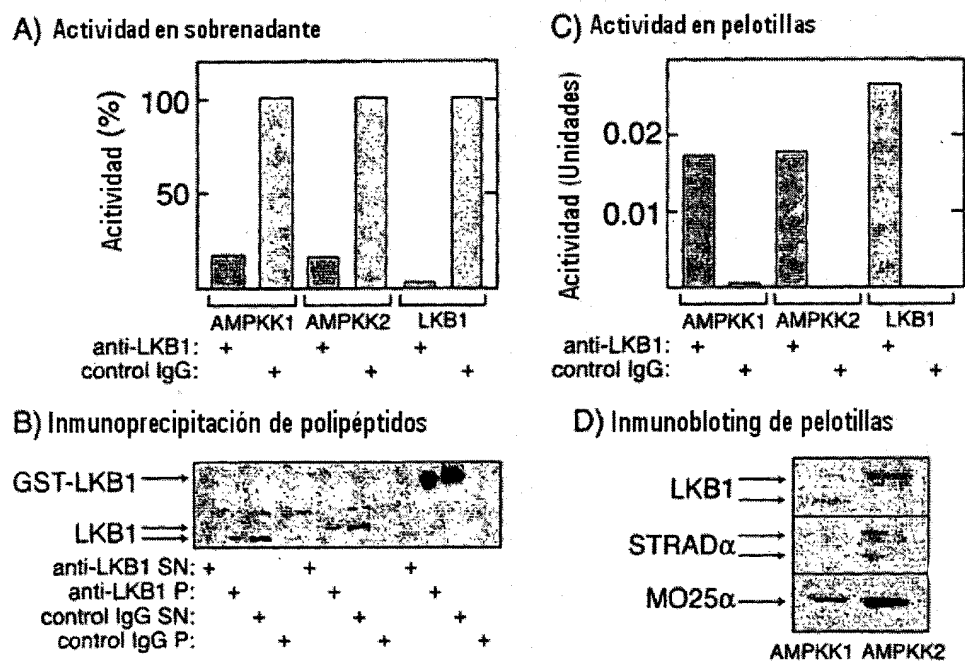


Figura 15

A) Activación de dominio catalizador AMPK α por LKB1

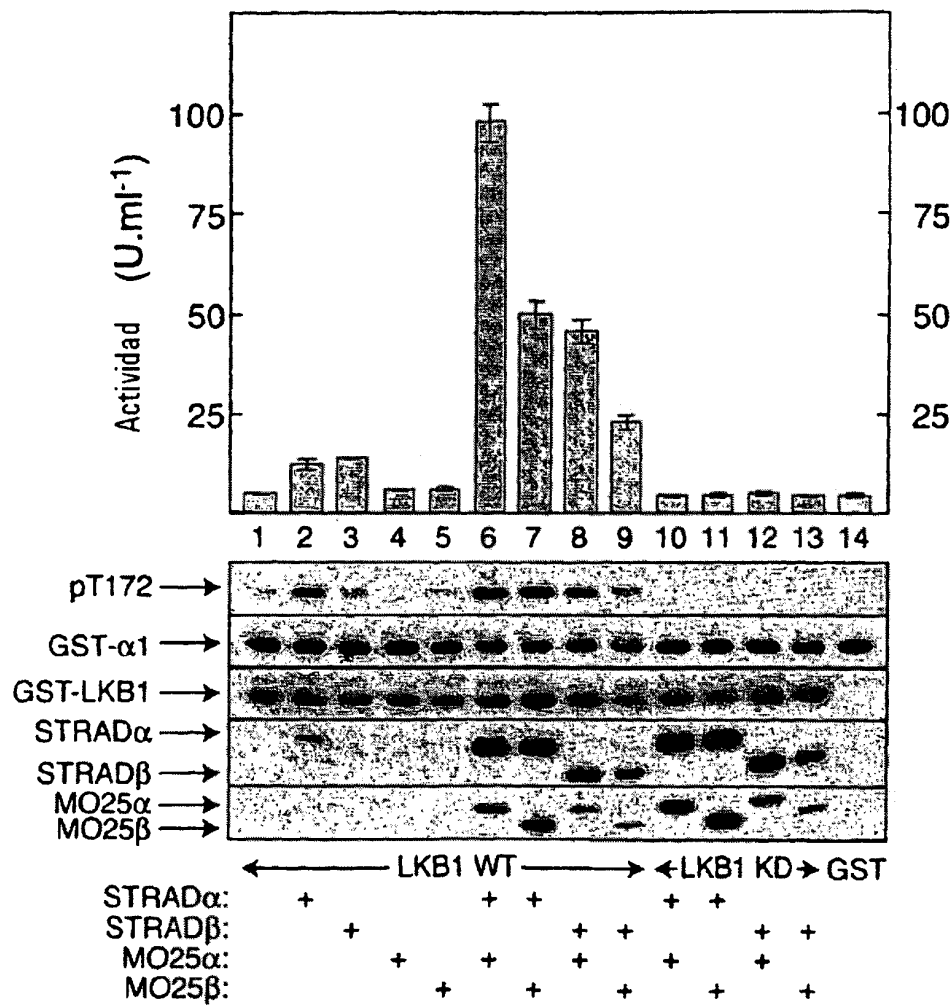


Figura 15a

B) Fosforilación de dominio catalizador AMPK α 1 por LKB

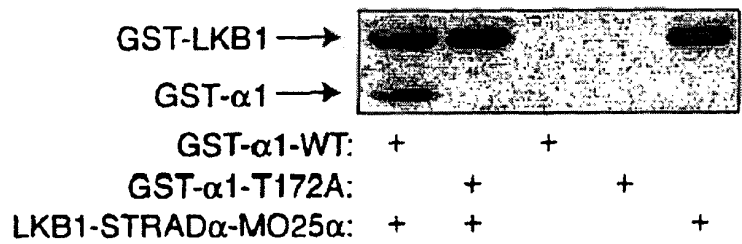


Figura 16

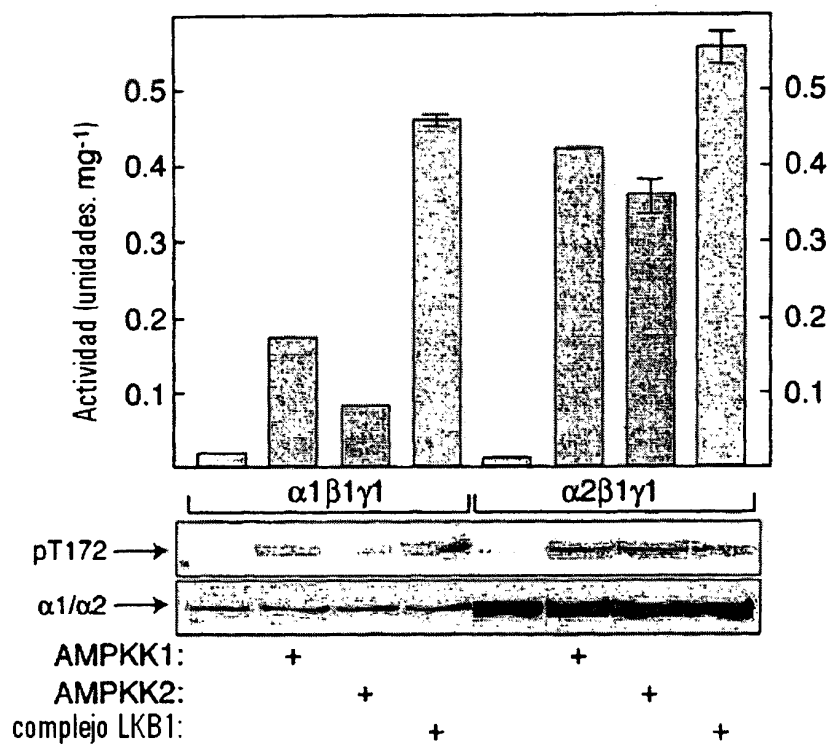


Figura 17

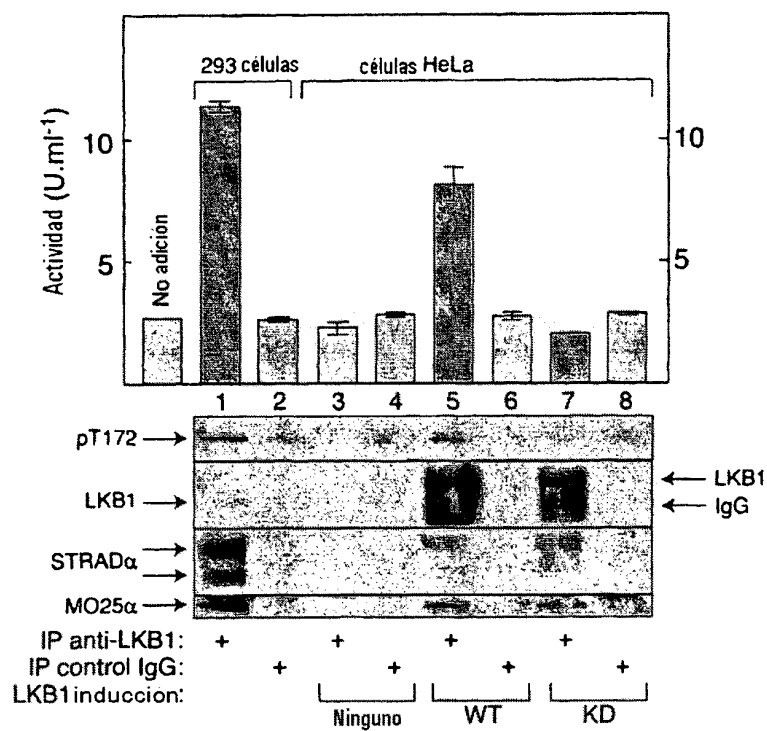


Figura 18

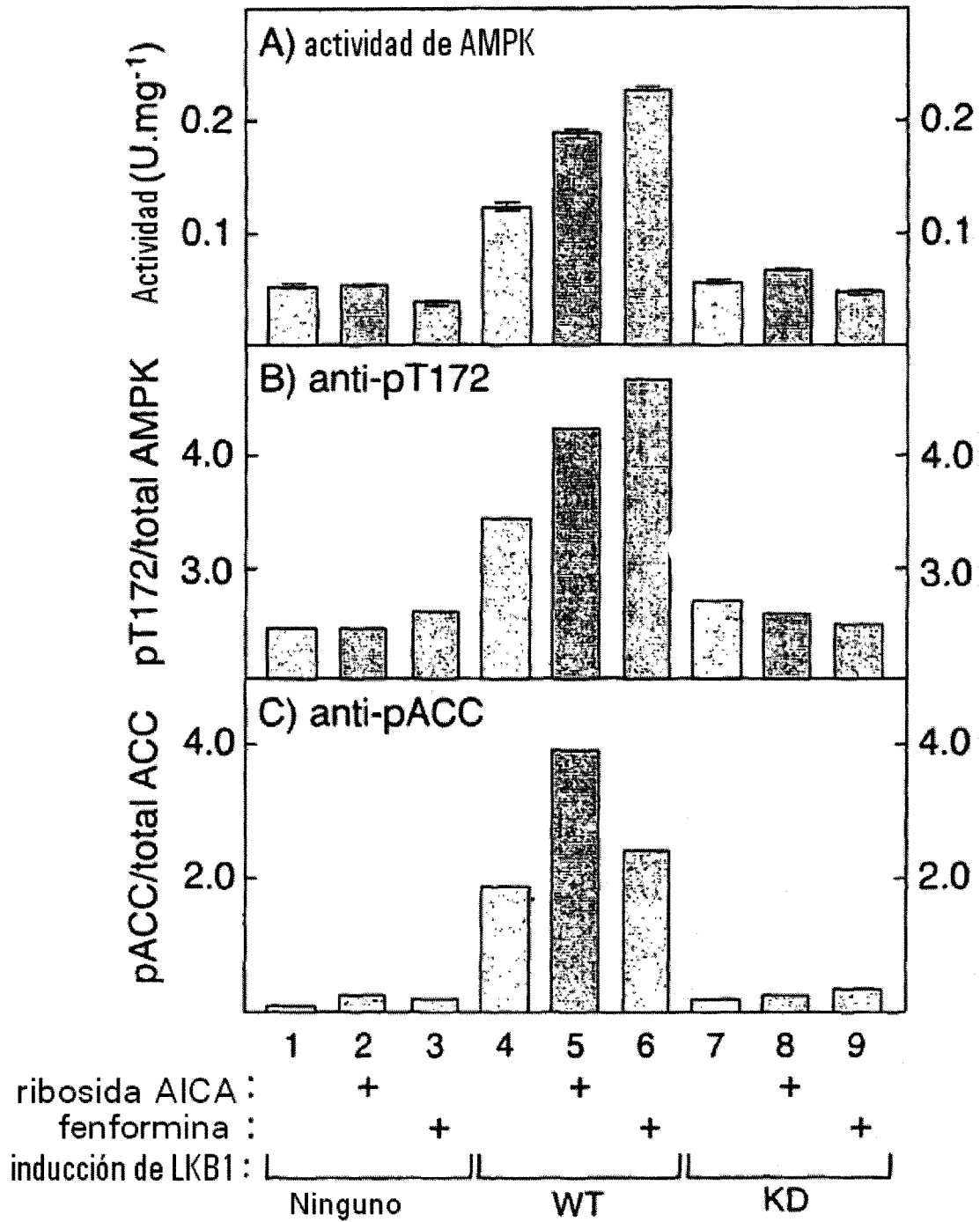


Figura 19

			-11 ↓	-12 ↓	-10 ↓	-9 ↓	-5 ↓	-3 ↓	-2 ↓	P ↓
PKA-Cα	239	DFGFAKR..V.KG.RTWTL	CGTPEYLAPE							
PKCα	539	DFGMCKEHMM.DGVTTR	TFCGTPDYIAPE							
NuaK1	196	DFGLSNLYQKDK..FLQT	FCGSPLYASPE							
NuaK2	237	DFGLSNLYHQGK..FLQT	FCGSPLYASPE							
BrsK1	190	DFGMASLQVGDS..LLET	SCGSPHYACPE							
BrsK2	159	DFGMASLQVGDS..LLET	SCGSPHYACPE							
SIK	167	DFGFGNFYKSGE..PLST	WCGSPPYAAPE							
QIK	160	DFGFGNFYKSGE..LLAT	WCGSPPYAAPE							
AtSnRK1-α1	160	DFGLSNIMRDGH..FLKT	SCGSPNYAAPE							
AtSnRK1-α2	161	DFGLSNVIMRDGH..FLKT	SCGSPNYAAPE							
AMPK-α1	159	DFGLSNMMSDGE..FLRT	SCGSPNYAAPE							
AMPK-α2	157	DFGLSNMMSDGE..FLRT	SCGSPNYAAPE							
ScSnf1	195	DFGLSNIMTDGN..FLKT	SCGSPNYAAPE							
QSK	206	DFGFSNLFTPGQ..LLKT	WCGSPPYAAPE							
MELK	150	DFGLCAKPKGNKDYHLQ	TCCGSLAYAAPE							
consenso	243	DFGLsnl	g fL TsCGSp YAaPE							

Figura 20

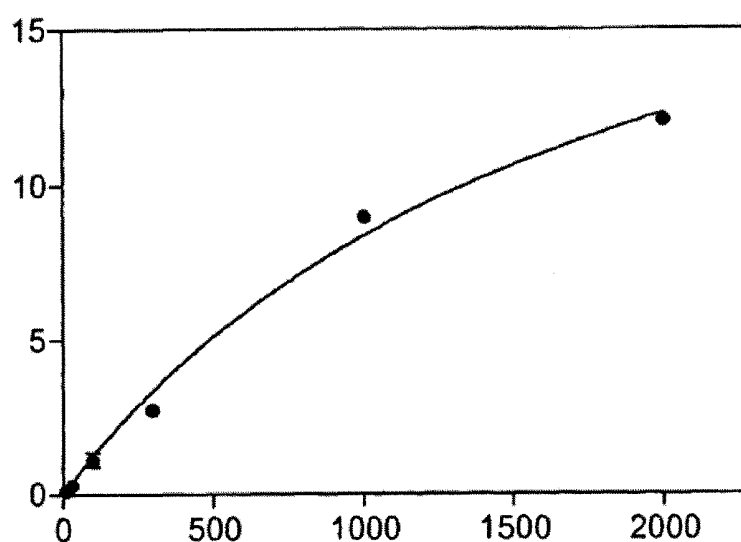
AMPKtido (μM) $K_m: 1.80 \pm 0.48$ $V_{max}: 23.43 \pm 3.51 \text{ U/mg}$

Figura 21

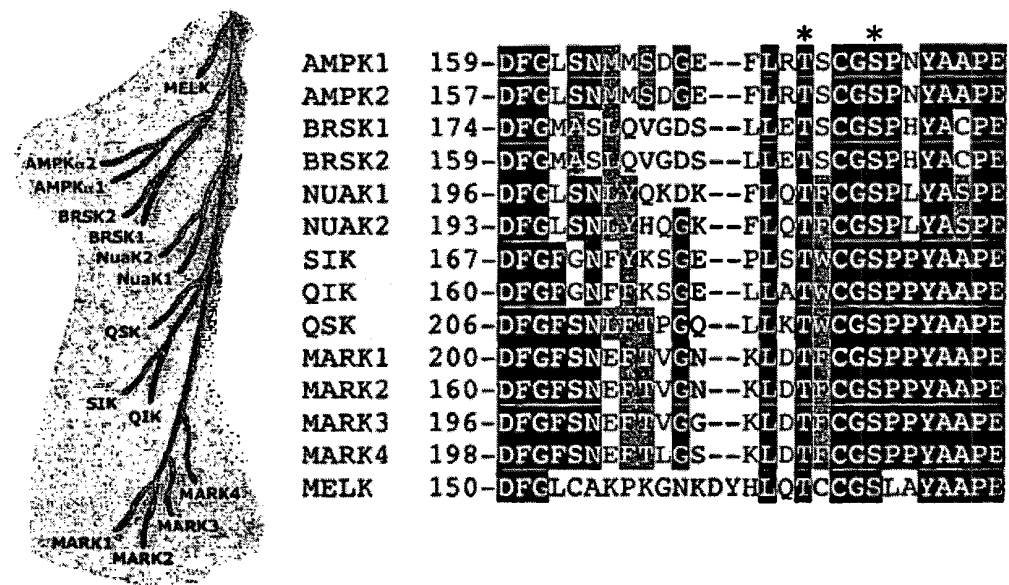


Figura 21A

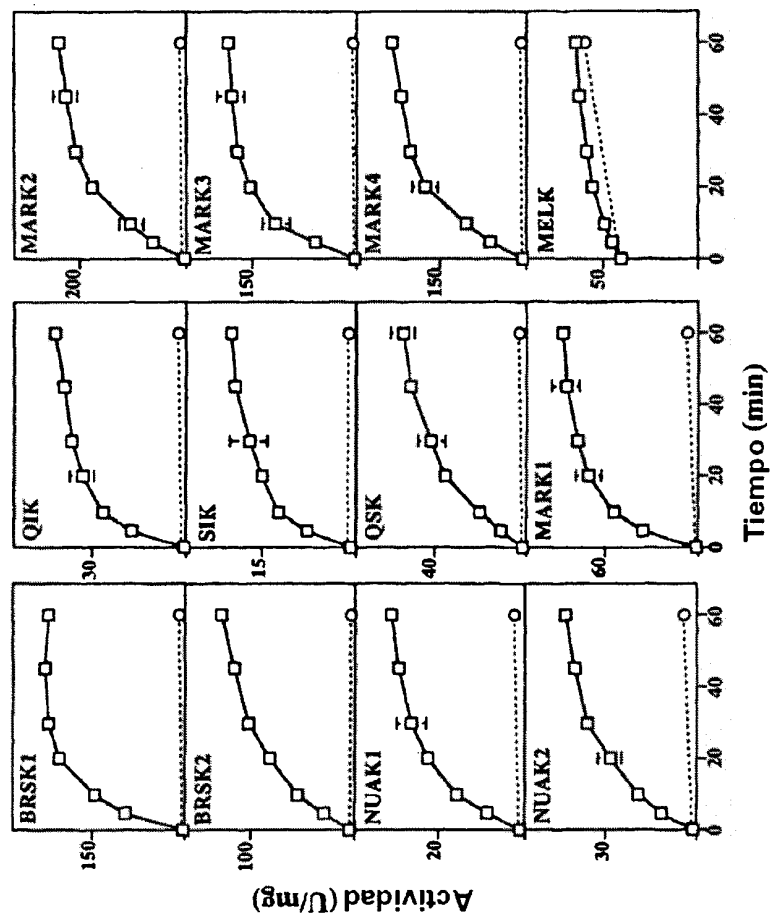


Figura 22

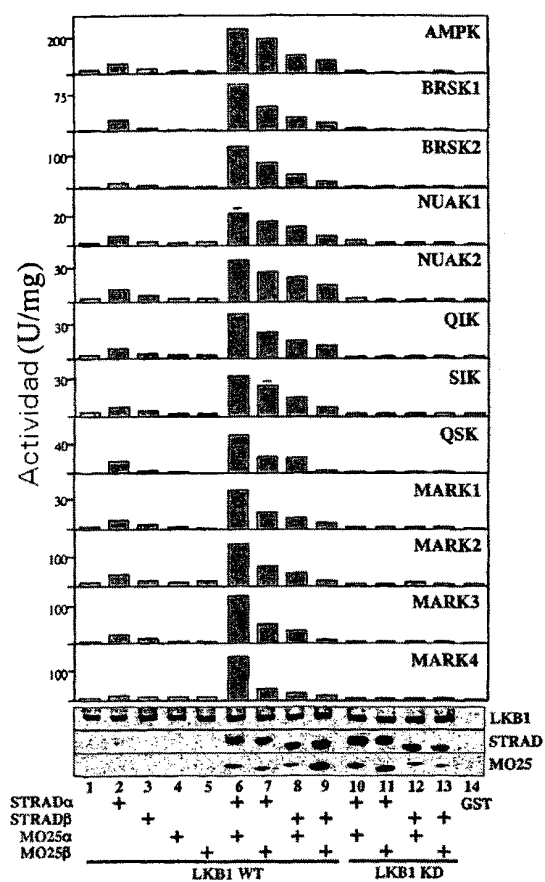


Figura 23

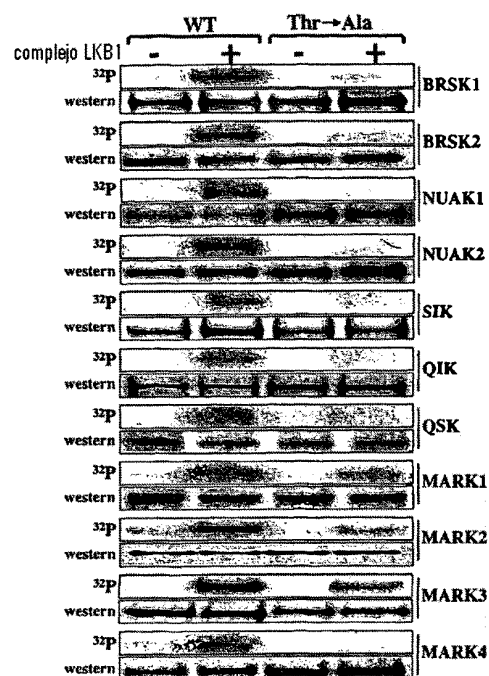


Figura 24

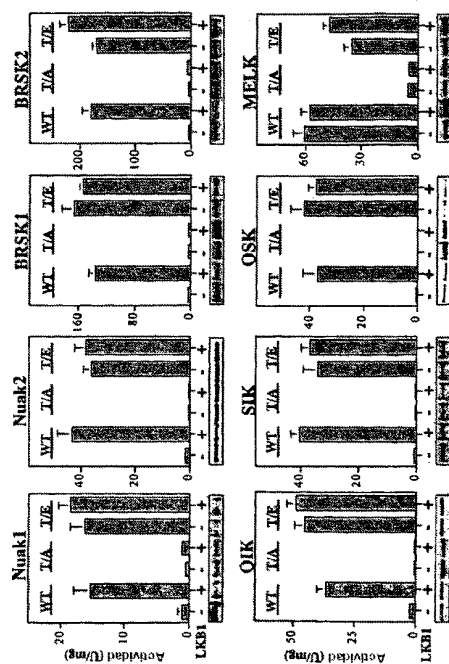


Figura 25

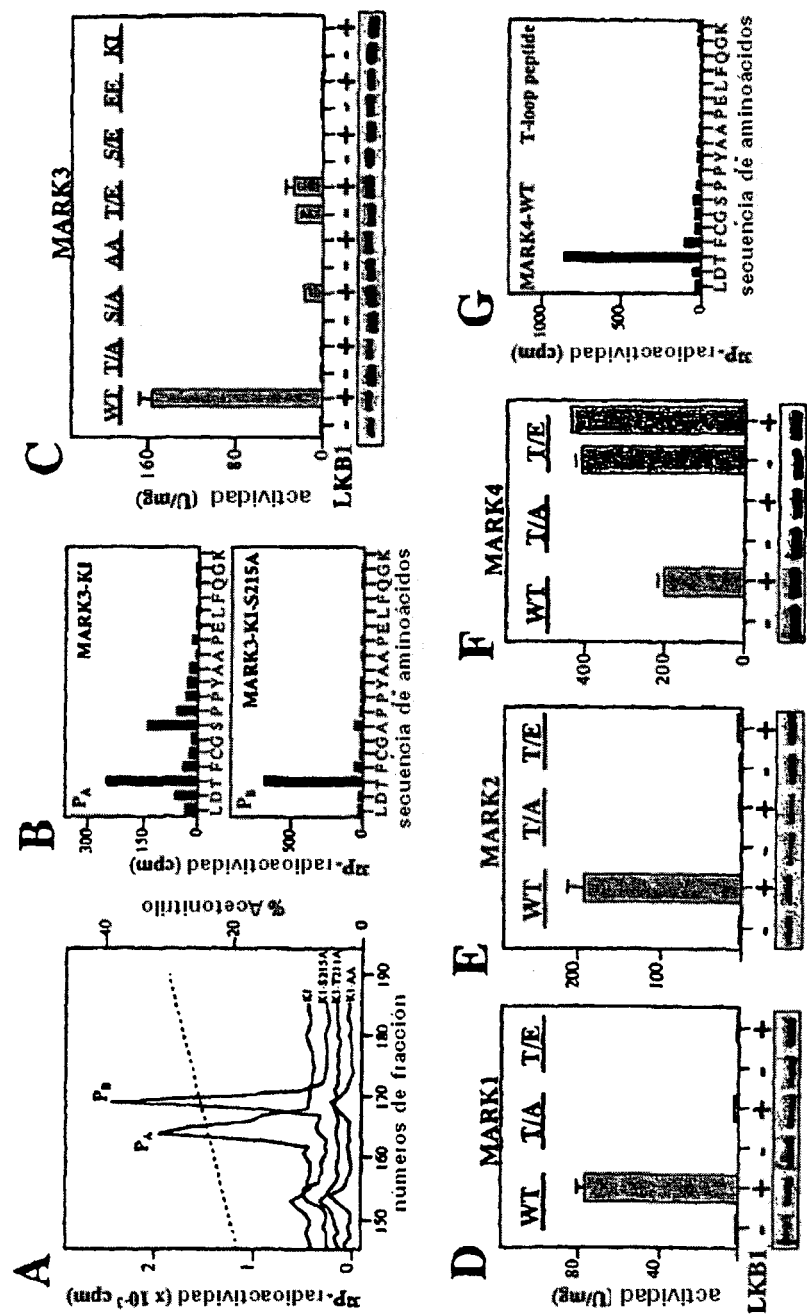


Figura 26

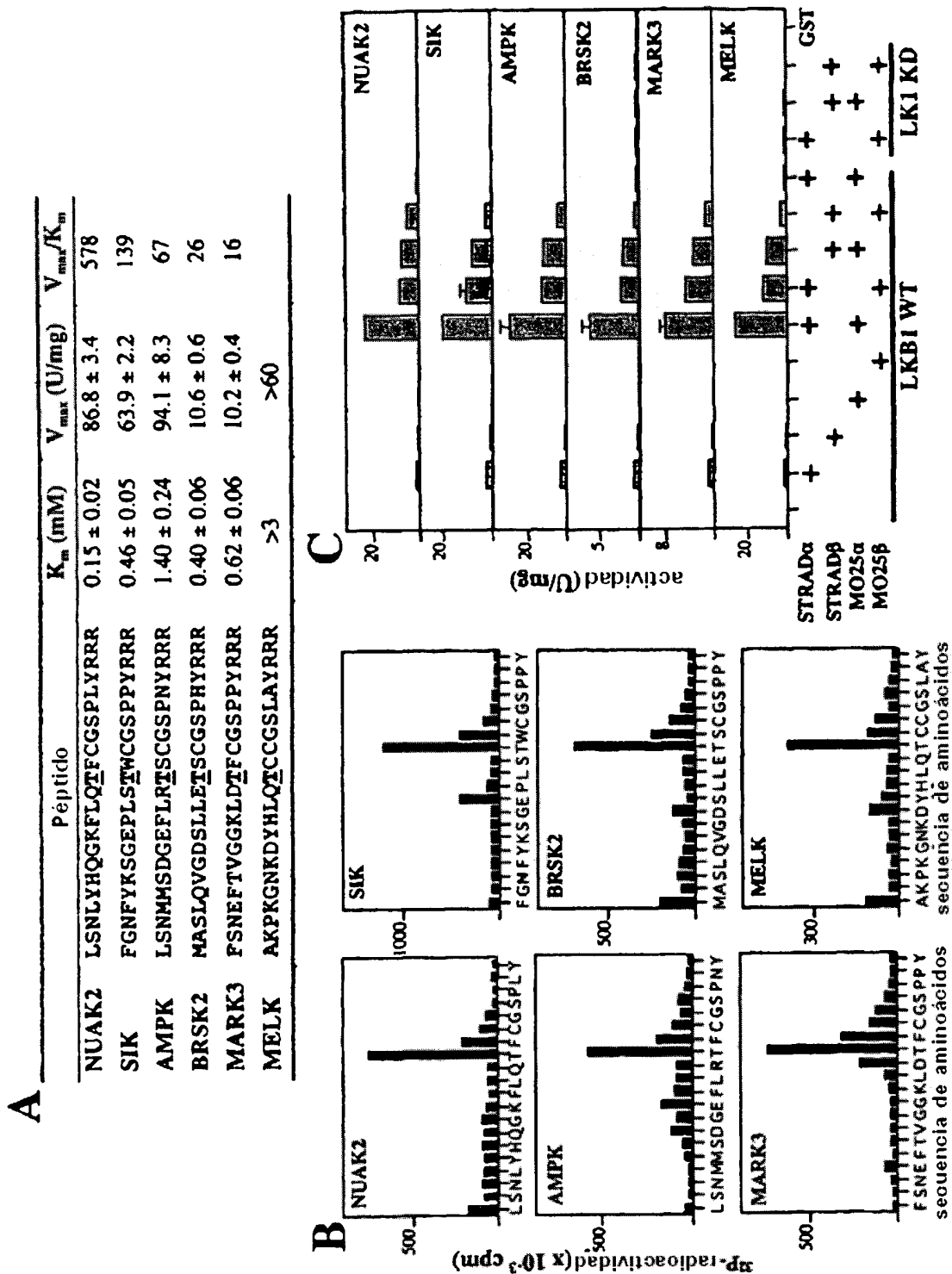


Figura 27

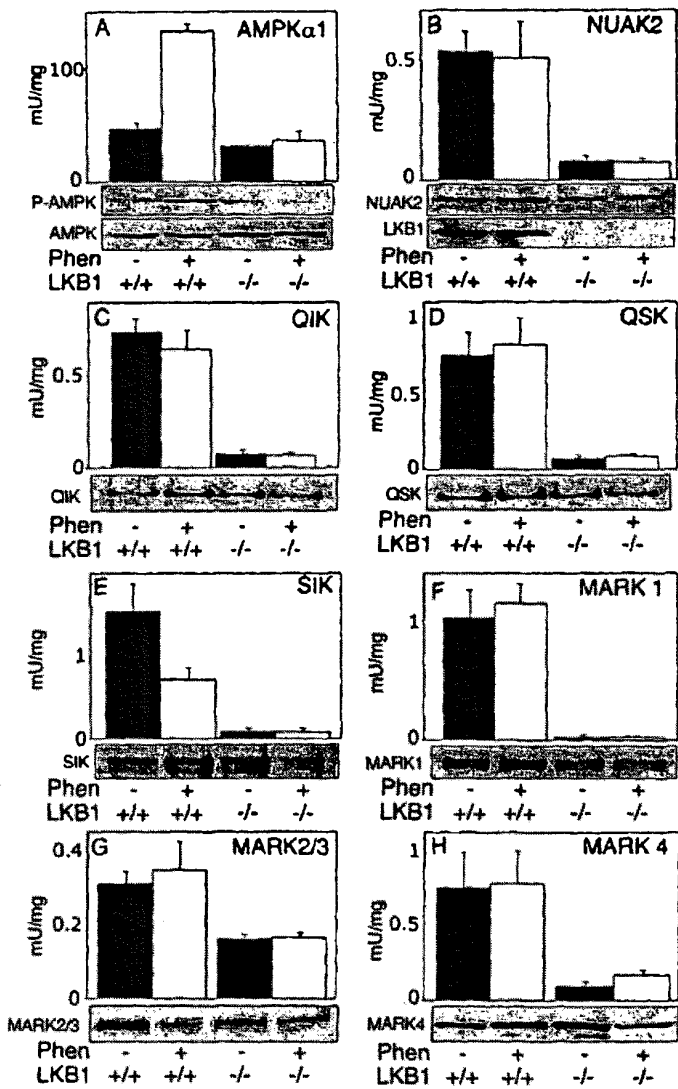


Figura 28

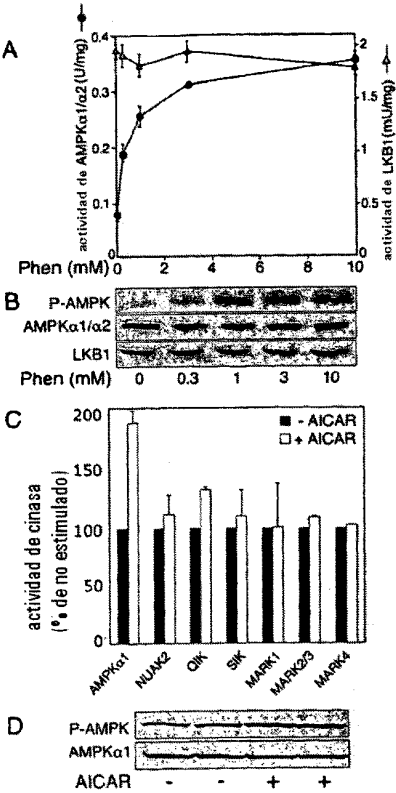


Figura 29

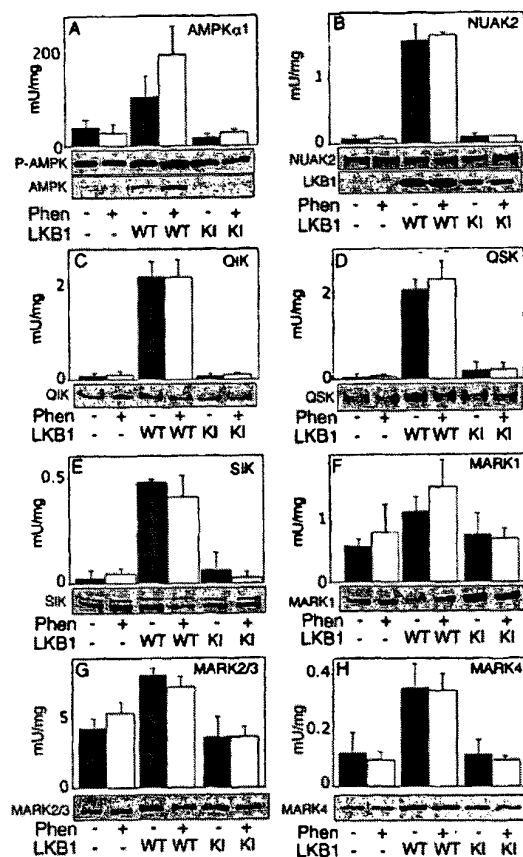
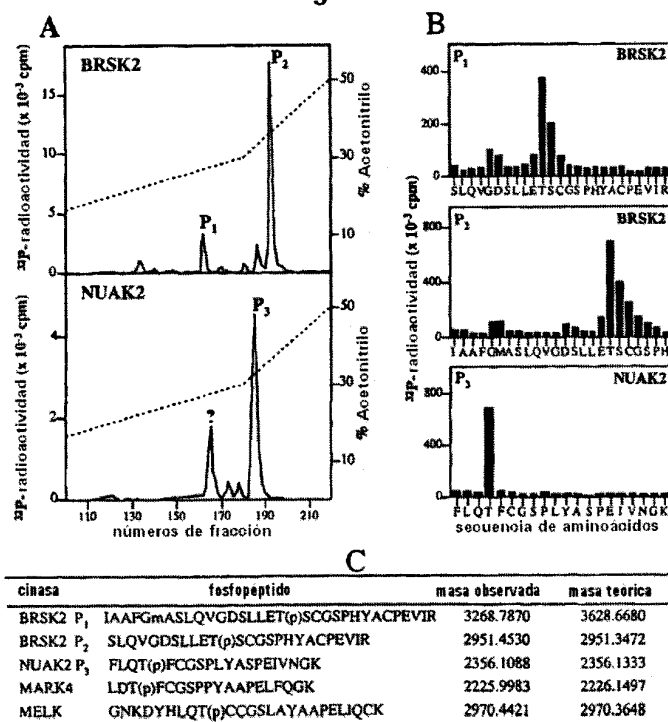


Figura 30



ES 2 308 198 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Dundee
<120> Métodos
5 <130> DUNY/P30950PC
<160> 158
<170> Versión Patentin 3.1
10 <210> 1
<211> 550
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
15 <400> 1

20 Met Ala Thr Ala Glu Lys Gln Lys His Asp Gly Arg Val Lys Ile Gly
1 5 10 15
His Tyr Ile Leu Gly Asp Thr Leu Gly Val Gly Thr Phe Gly Lys Val
20 25 30
25 Lys Val Gly Lys His Glu Leu Thr Gly His Lys Val Ala Val Lys Ile
35 40 45
30 Leu Asn Arg Gln Lys Ile Arg Ser Leu Asp Val Val Gly Lys Ile Arg
50 55 60

35
40
45
50
55
60
65

ES 2 308 198 T3

Arg Glu Ile Gln Asn Leu Lys Leu Phe Arg His Pro His Ile Ile Lys
 65 70 75 80
 Leu Tyr Gln Val Ile Ser Thr Pro Ser Asp Ile Phe Met Val Met Glu
 85 90 95
 Tyr Val Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Tyr Ile Cys Lys Asn Gly Arg
 100 105 110
 Leu Asp Glu Lys Glu Ser Arg Arg Leu Phe Gln Gln Ile Leu Ser Gly
 115 120 125
 Val Asp Tyr Cys His Arg His Met Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro
 130 135 140
 Glu Asn Val Leu Leu Asp Ala His Met Asn Ala Lys Ile Ala Asp Phe
 145 150 155 160
 Gly Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys
 165 170 175
 Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Val Ile Ser Gly Arg Leu Tyr
 180 185 190
 Ala Gly Pro Glu Val Asp Ile Trp Ser Ser Gly Val Ile Leu Tyr Ala
 195 200 205
 Leu Leu Cys Gly Thr Leu Pro Phe Asp Asp Asp His Val Pro Thr Leu
 210 215 220
 Phe Lys Lys Ile Cys Asp Gly Ile Phe Tyr Thr Pro Gln Tyr Leu Asn
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Ile Ser Leu Leu Lys His Met Leu Gln Val Asp Pro Met
 245 250 255
 Lys Arg Ala Thr Ile Lys Asp Ile Arg Glu His Glu Trp Phe Lys Gln
 260 265 270
 Asp Leu Pro Lys Tyr Leu Phe Pro Glu Asp Pro Ser Tyr Ser Ser Thr
 275 280 285
 Met Ile Asp Asp Glu Ala Leu Lys Glu Val Cys Glu Lys Phe Glu Cys
 290 295 300
 Ser Glu Glu Glu Val Leu Ser Cys Leu Tyr Asn Arg Asn His Gln Asp
 305 310 315 320
 Pro Leu Ala Val Ala Tyr His Leu Ile Ile Asp Asn Arg Arg Ile Met
 325 330 335
 Asn Glu Ala Lys Asp Phe Tyr Leu Ala Thr Ser Pro Pro Asp Ser Phe
 340 345 350
 Leu Asp Asp His His Leu Thr Arg Pro His Pro Glu Arg Val Pro Phe
 355 360 365
 Leu Val Ala Glu Thr Pro Arg Ala Arg His Thr Leu Asp Glu Leu Asn
 370 375 380
 Pro Gln Lys Ser Lys His Gln Gly Val Arg Lys Ala Lys Trp His Leu
 385 390 395 400
 Gly Ile Arg Ser Gln Ser Arg Pro Asn Asp Ile Met Ala Glu Val Cys
 405 410 415
 Arg Ala Ile Lys Gln Leu Asp Tyr Glu Trp Lys Val Val Asn Pro Tyr
 420 425 430
 Tyr Leu Arg Val Arg Arg Lys Asn Pro Val Thr Ser Thr Tyr Ser Lys
 435 440 445
 Met Ser Leu Gln Leu Tyr Gln Val Asp Ser Arg Thr Tyr Leu Leu Asp
 450 455 460
 Phe Arg Ser Ile Asp Asp Glu Ile Thr Glu Ala Lys Ser Gly Thr Ala

ES 2 308 198 T3

465 470 475 480
 Thr Pro Gln Arg Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Arg Ser Cys Gln Arg
 485 490 495
 5 Ser Asp Ser Asp Ala Glu Ala Gln Gly Lys Ser Ser Glu Val Ser Leu
 500 505 510
 Thr Ser Ser Val Thr Ser Leu Asp Ser Ser Pro Val Asp Leu Thr Pro
 515 520 525
 10 Arg Pro Gly Ser His Thr Ile Glu Phe Phe Glu Met Cys Ala Asn Leu
 530 535 540
 Ile Lys Ile Leu Ala Gln
 545 550
 15
 <210> 2
 <211> 550
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2
 25 Met Ala Thr Ala Glu Lys Gln Lys His Asp Gly Arg Val Lys Ile Gly
 5 10 15
 His Tyr Ile Leu Gly Asp Thr Leu Gly Val Gly Thr Phe Gly Lys Val
 20 25 30
 30 Lys Val Gly Lys His Glu Leu Thr Gly His Lys Val Ala Val Lys Ile
 35 40 45
 Leu Asn Arg Gln Lys Ile Arg Ser Leu Asp Val Val Gly Lys Ile Arg
 50 55 60
 35 Arg Glu Ile Gln Asn Leu Lys Leu Phe Arg His Pro His Ile Ile Lys
 65 70 75 80
 40 Leu Tyr Gln Val Ile Ser Thr Pro Ser Asp Ile Phe Met Val Met Glu
 85 90 95
 Tyr Val Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Tyr Ile Cys Lys Asn Gly Arg
 100 105 110
 45 Leu Asp Glu Lys Glu Ser Arg Arg Leu Phe Gln Gln Ile Leu Ser Gly
 115 120 125
 Val Asp Tyr Cys His Arg His Met Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro
 130 135 140
 50 Glu Asn Val Leu Leu Asp Ala His Met Asn Ala Lys Ile Ala Asp Phe
 145 150 155 160
 Gly Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys
 165 170 175
 55 Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Val Ile Ser Gly Arg Leu Tyr
 180 185 190
 Ala Gly Pro Glu Val Asp Ile Trp Ser Ser Gly Val Ile Leu Tyr Ala
 195 200 205
 60 Leu Leu Cys Gly Thr Leu Pro Phe Asp Asp Asp His Val Pro Thr Leu
 210 215 220
 Phe Lys Lys Ile Cys Asp Gly Ile Phe Tyr Thr Pro Gln Tyr Leu Asn
 225 230 235 240
 65 Pro Ser Val Ile Ser Leu Leu Lys His Met Leu Gln Val Asp Pro Met
 245 250 255

ES 2 308 198 T3

Lys Arg Ala Ser Ile Lys Asp Ile Arg Glu His Glu Trp Phe Lys Gln
 260 265 270
 Asp Leu Pro Lys Tyr Leu Phe Pro Glu Asp Pro Ser Tyr Ser Ser Thr
 275 280 285
 Met Ile Asp Asp Glu Ala Leu Lys Glu Val Cys Glu Lys Phe Glu Cys
 290 295 300
 Ser Glu Glu Glu Val Leu Ser Cys Leu Tyr Asn Arg Asn His Gln Asp
 305 310 315 320
 Pro Leu Ala Val Ala Tyr His Leu Ile Ile Asp Asn Arg Arg Ile Met
 325 330 335
 Asn Glu Ala Lys Asp Phe Tyr Leu Ala Thr Ser Pro Pro Asp Ser Phe
 340 345 350
 Leu Asp Asp His His Leu Thr Arg Pro His Pro Glu Arg Val Pro Phe
 355 360 365
 Leu Val Ala Glu Thr Pro Arg Ala Arg His Thr Leu Asp Glu Leu Asn
 370 375 380
 Pro Gln Lys Ser Lys His Gln Gly Val Arg Lys Ala Lys Trp His Leu
 385 390 395 400
 Gly Ile Arg Ser Gln Ser Arg Pro Asn Asp Ile Met Ala Glu Val Cys
 405 410 415
 Arg Ala Ile Lys Gln Leu Asp Tyr Glu Trp Lys Val Val Asn Pro Tyr
 420 425 430
 Tyr Leu Arg Val Arg Arg Lys Asn Pro Val Thr Ser Thr Tyr Ser Lys
 435 440 445
 Met Ser Leu Gln Leu Tyr Gln Val Asp Ser Arg Thr Tyr Leu Leu Asp
 450 455 460
 Phe Arg Ser Ile Asp Asp Glu Ile Thr Glu Ala Lys Ser Gly Thr Ala
 465 470 475 480
 Thr Pro Gln Arg Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Arg Ser Cys Gln Arg
 485 490 495
 Ser Asp Ser Asp Ala Glu Ala Gln Gly Lys Ser Ser Glu Val Ser Leu
 500 505 510
 Thr Ser Ser Val Thr Ser Leu Asp Ser Ser Pro Val Asp Leu Thr Pro
 515 520 525
 Arg Pro Gly Ser His Thr Ile Glu Phe Phe Glu Met Cys Ala Asn Leu
 530 535 540
 Ile Lys Ile Leu Ala Gln
 545 550

<210> 3

<211> 550

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Ala Thr Ala Glu Lys Gln Lys His Asp Gly Arg Val Lys Ile Gly
 1 5 10 15
 His Tyr Ile Leu Gly Asp Thr Leu Gly Val Gly Thr Phe Gly Lys Val
 20 25 30
 Lys Val Gly Lys His Glu Leu Thr Gly His Lys Val Ala Val Lys Ile
 35 40 45

ES 2 308 198 T3

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

ES 2 308 198 T3

Pro Gln Lys Ser Lys His Gln Gly Val Arg Lys Ala Lys Trp His Leu
 385 390 395 400
 Gly Ile Arg Ser Gln Ser Arg Pro Asn Asp Ile Met Ala Glu Val Cys
 405 410 415
 Arg Ala Ile Lys Gln Leu Asp Tyr Glu Trp Lys Val Val Asn Pro Tyr
 420 425 430
 Tyr Leu Arg Val Arg Arg Lys Asn Pro Val Thr Ser Thr Tyr Ser Lys
 435 440 445
 Met Ser Leu Gln Leu Tyr Gln Val Asp Ser Arg Thr Tyr Leu Leu Asp
 450 455 460
 Phe Arg Ser Ile Asp Asp Glu Ile Thr Glu Ala Lys Ser Gly Thr Ala
 465 470 475 480
 Thr Pro Gln Arg Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Arg Ser Cys Gln Arg
 485 490 495
 Ser Asp Ser Asp Ala Glu Ala Gln Gly Lys Ser Ser Glu Val Ser Leu
 500 505 510
 Thr Ser Ser Val Thr Ser Leu Asp Ser Ser Pro Val Asp Leu Thr Pro
 515 520 525
 Arg Pro Gly Ser His Thr Ile Glu Phe Phe Glu Met Cys Ala Asn Leu
 530 535 540
 Ile Lys Ile Leu Ala Gln
 545 550
 <210> 4
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4
 Gly Glu His Gln Leu Thr Gly His Lys Val Ala Val Lys Ile Leu Asn
 1 5 10 15
 Arg Gln Lys Ile Arg Ser Leu Asp Val Val Gly Lys Ile Lys Arg Glu
 20 25 30
 Ile Gln Asn Leu Lys Leu Phe Arg His Pro His Ile Ile Lys Leu Tyr
 35 40 45
 Gln Val Ile Ser Thr Pro Thr Asp Phe Phe Met Val Met Glu Tyr Val
 50 55 60
 Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Tyr Ile Cys Lys His Gly Arg Val Glu
 65 70 75 80
 Glu Met Glu Ala Arg Arg Leu Phe Gln Gln Ile Leu Ser Ala Val Asp
 85 90 95
 Tyr Cys His Arg His Met Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn
 100 105 110
 Val Leu Leu Asp Ala His Met Asn Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu
 115 120 125
 Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys Gly Ser
 130 135 140
 Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Val Ile Ser Gly Arg Leu Tyr Ala Gly
 145 150 155 160
 Pro Glu Val Asp Ile Trp Ser Cys Gly Val Ile Leu Tyr Ala Leu Leu
 165 170 175

ES 2 308 198 T3

Cys Gly Thr Leu Pro Phe Asp Asp Glu His Val Pro Thr Leu Phe Lys
 180 185 190
 5 Lys Ile Arg Gly Gly Val Phe Tyr Ile Pro Glu Tyr Leu Asn Arg Ser
 195 200 205
 Val Ala Thr Leu Leu Met His Met Leu Gln Val Asp Pro Leu Lys Arg
 210 215 220
 10 Ala Thr Ile Lys Asp Ile Arg Glu His Glu Trp Phe Lys Gln Asp Leu
 225 230 235 240
 Pro Ser Tyr Leu Phe Pro Glu Asp Pro Ser Tyr Asp Ala Asn Val Ile
 245 250 255
 15 Asp Asp Glu Ala Val Lys Glu Val Cys Glu Lys Phe Glu Cys Thr Glu
 260 265 270
 Ser Glu Val Met Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Asp Pro Gln Asp Gln Leu
 275 280 285
 20 Ala Val Ala Tyr His Leu Ile Ile Asp Asn Arg Arg Ile Met Asn Gln
 290 295 300
 Ala Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Gly Ser Phe Met
 305 310 315 320
 Asp Asp Ser Ala Met His Ile Pro Pro Gly Leu Lys Pro His Pro Glu
 325 330 335
 30 Arg Met Pro Pro Leu Ile Ala Asp Ser Pro Lys Ala Arg Cys Pro Leu
 340 345 350
 Asp Ala Leu Asn Thr Thr Lys Pro Lys Ser Leu Ala Val Lys Lys Ala
 355 360 365
 35 Lys Trp His Leu Gly Ile Arg Ser Gln Ser Lys Pro Tyr Asp Ile Met
 370 375 380
 Ala Glu Val Tyr Arg Ala Met Lys Gln Leu Asp Phe Glu Trp Lys Val
 385 390 395 400
 40 Val Asn Ala Tyr His Leu Arg Val Arg Arg Lys Asn Pro Val Thr Gly
 405 410 415
 Asn Tyr Val Lys Met Ser Leu Gln Leu Tyr Leu Val Asp Asn Arg Ser
 420 425 430
 45 Tyr Leu Leu Asp Phe Lys Ser Ile Asp Asp Glu Val Val Glu Gln Arg
 435 440 445
 Ser Gly Ser Ser Thr Pro Gln Arg Ser Cys Ser Ala Ala Gly Leu His
 450 455 460
 Arg Pro Arg Ser Ser Phe Asp Ser Thr Thr Ala Glu Ser His Ser Leu
 465 470 475 480
 50 Ser Gly Ser Leu Thr Gly Ser Leu Thr Gly Ser Thr Leu Ser Ser Val
 485 490 495
 Ser Pro Arg Leu Gly Ser His Thr Met Asp Phe Phe Glu Met Cys Ala
 500 505 510
 60 Ser Leu Ile Thr Thr Leu Ala Arg
 515 520

<210> 5

65 <211> 552

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 5

Met Ala Glu Lys Gln Lys His Asp Gly Arg Val Lys Ile Gly His Tyr
1 5 10 15

Val Leu Gly Asp Thr Leu Gly Val Gly Thr Phe Gly Lys Val Lys Ile
20 25 30

Gly Glu His Gln Leu Thr Gly His Lys Val Ala Val Lys Ile Leu Asn
35 40 45

Arg Gln Lys Ile Arg Ser Leu Asp Val Val Gly Lys Ile Lys Arg Glu
50 55 60

Ile Gln Asn Leu Lys Leu Phe Arg His Pro His Ile Ile Lys Leu Tyr
65 70 75 80

Gln Val Ile Ser Thr Pro Thr Asp Phe Phe Met Val Met Glu Tyr Val
85 90 95

Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Tyr Ile Cys Lys His Gly Arg Val Glu
100 105 110

Glu Met Glu Ala Arg Arg Leu Phe Gln Gln Ile Leu Ser Ala Val Asp
115 120 125

Tyr Cys His Arg His Met Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn
130 135 140

Val Leu Leu Asp Ala His Met Asn Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu
145 150 155 160

Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys Gly Ser
165 170 175

Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Val Ile Ser Gly Arg Leu Tyr Ala Gly
180 185 190

Pro Glu Val Asp Ile Trp Ser Cys Gly Val Ile Leu Tyr Ala Leu Leu
195 200 205

Cys Gly Thr Leu Pro Phe Asp Asp Glu His Val Pro Thr Leu Phe Lys
210 215 220

Lys Ile Arg Gly Gly Val Phe Tyr Ile Pro Glu Tyr Leu Asn Arg Ser
225 230 235 240

Val Ala Thr Leu Leu Met His Met Leu Gln Val Asp Pro Leu Lys Arg
245 250 255

Ala Thr Ile Lys Asp Ile Arg Glu His Glu Trp Phe Lys Gln Asp Leu
260 265 270

Pro Ser Tyr Leu Phe Pro Glu Asp Pro Ser Tyr Asp Ala Asn Val Ile
275 280 285

Asp Asp Glu Ala Val Lys Glu Val Cys Glu Lys Phe Glu Cys Thr Glu
290 295 300

Ser Glu Val Met Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Asp Pro Gln Asp Gln Leu
305 310 315 320

Ala Val Ala Tyr His Leu Ile Ile Asp Asn Arg Arg Ile Met Asn Gln
325 330 335

Ala Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Gly Ser Phe Met
340 345 350

Asp Asp Ser Ala Met His Ile Pro Pro Gly Leu Lys Pro His Pro Glu
355 360 365

Arg Met Pro Pro Leu Ile Ala Asp Ser Pro Lys Ala Arg Cys Pro Leu
370 375 380

ES 2 308 198 T3

Asp Ala Leu Asn Thr Thr Lys Pro Lys Ser Leu Ala Val Lys Lys Ala
 385 390 395 400
 Lys Trp His Leu Gly Ile Arg Ser Gln Ser Lys Pro Tyr Asp Ile Met
 405 410 415
 Ala Glu Val Tyr Arg Ala Met Lys Gln Leu Asp Phe Glu Trp Lys Val
 420 425 430
 Val Asn Ala Tyr His Leu Arg Val Arg Arg Lys Asn Pro Val Thr Gly
 435 440 445
 Asn Tyr Val Lys Met Ser Leu Gln Leu Tyr Leu Val Asp Asn Arg Ser
 450 455 460
 Tyr Leu Leu Asp Phe Lys Ser Ile Asp Asp Glu Val Val Glu Gln Arg
 465 470 475 480
 Ser Gly Ser Ser Thr Pro Gln Arg Ser Cys Ser Ala Ala Gly Leu His
 485 490 495
 Arg Pro Arg Ser Ser Phe Asp Ser Thr Thr Ala Glu Ser His Ser Leu
 500 505 510
 Ser Gly Ser Leu Thr Gly Ser Leu Thr Gly Ser Thr Leu Ser Ser Val
 515 520 525
 Ser Pro Arg Leu Gly Ser His Thr Met Asp Phe Phe Glu Met Cys Ala
 530 535 540
 Ser Leu Ile Thr Thr Leu Ala Arg
 545 550
 <210> 6
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6
 Met Glu Val Val Asp Pro Gln Gln Leu Gly Met Phe Thr Glu Gly Glu
 1 5 10 15
 Leu Met Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr
 20 25 30
 Glu Val Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys
 35 40 45
 Tyr Leu Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys
 50 55 60
 Glu Val Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu
 65 70 75 80
 Lys Lys Lys Lys Leu Arg Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys
 85 90 95
 Lys Glu Ile Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg His Lys Asn Val Ile Gln
 100 105 110
 Leu Val Asp Val Leu Tyr Asn Glu Glu Lys Gln Lys Met Tyr Met Val
 115 120 125
 Met Glu Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln Glu Met Leu Asp Ser Val Pro
 130 135 140
 Glu Lys Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala His Gly Tyr Phe Cys Gln Leu
 145 150 155 160
 Ile Asp Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp
 165 170 175
 Ile Lys Pro Gly Asn Leu Leu Leu Thr Thr Gly Gly Thr Leu Lys Ile
 180 185 190

ES 2 308 198 T3

Ser Asp Leu Gly Val Ala Glu Ala Leu His Pro Phe Ala Ala Asp Asp
 195 200 205
 5 Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile
 210 215 220
 Ala Asn Gly Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser
 225 230 235 240
 10 Ala Gly Val Thr Leu Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro Phe Glu
 245 250 255
 Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Lys Gly Ser Tyr
 260 265 270
 15 Ala Ile Pro Gly Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu Lys Gly
 275 280 285
 Met Leu Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser Ile Arg Gln Ile Arg
 290 295 300
 20 Gln His Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro Pro Ala Glu Ala Pro Val
 305 310 315 320
 Pro Ile Pro Pro Ser Pro Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr
 325 330 335
 25 Val Val Pro Tyr Leu Glu Asp Leu His Gly Ala Asp Glu Asp Glu Asp
 340 345 350
 Leu Phe Asp Ile Glu Asp Asp Ile Ile Tyr Thr Gln Asp Phe Thr Val
 355 360 365
 30 Pro Gly Gln Val Pro Glu Glu Glu Ala Ser His Asn Gly Gln Arg Arg
 370 375 380
 Gly Leu Pro Lys Ala Val Cys Met Asn Gly Thr Glu Ala Ala Gln Leu
 385 390 395 400
 35 Ser Thr Lys Ser Arg Ala Glu Gly Arg Ala Pro Asn Pro Ala Arg Lys
 405 410 415
 40 Ala Cys Ser Ala Ser Ser Lys Ile Arg Arg Leu Ser Ala Cys Lys Gln
 420 425 430
 Gln

ES 2 308 198 T3

<210> 7

<211> 433

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 308 198 T3

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

55

60

65

ES 2 308 198 T3

<210> 8

<211> 433

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

10      Met Glu Val Val Asp Pro Gln Gln Leu Gly Met Phe Thr Glu Gly Glu
      1      5      10      15
      Leu Met Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr
      20      25      30
15      Glu Val Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys
      35      40      45
      Tyr Leu Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys
      50      55      60
20      Glu Val Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu
      65      70      75      80
25
30
35
40
45
50
55
60
65

```

ES 2 308 198 T3

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

<210> 9

55 <211> 431

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <400> 9

Met Ser Phe Leu Val Ser Lys Pro Glu Arg Ile Arg Arg Trp Val Ser
 1 5 10 15
 65 Glu Lys Phe Ile Val Glu Gly Leu Arg Asp Leu Glu Leu Phe Gly Glu
 20 25 30

ES 2 308 198 T3

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

ES 2 308 198 T3

<210> 10

<211> 418

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

10      Met Ser Leu Leu Asp Cys Phe Cys Thr Ser Arg Thr Gln Val Glu Ser
       1          5          10          15

      Leu Arg Pro Glu Lys Gln Ser Glu Thr Ser Ile His Gln Tyr Leu Val
          20          25          30

15      Asp Glu Pro Thr Leu Ser Trp Ser Arg Pro Ser Thr Arg Ala Ser Glu
          35          40          45

      Val Leu Cys Ser Thr Asn Val Ser His Tyr Glu Leu Gln Val Glu Ile
          50          55          60

20      Gly Arg Gly Phe Asp Asn Leu Thr Ser Val His Leu Ala Arg His Thr
          65          70          75          80

      Pro Thr Gly Thr Leu Val Thr Ile Lys Ile Thr Asn Leu Glu Asn Cys
          85          90          95

25      Asn Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Gln Lys Ala Val Ile Leu Ser His
          100          105          110

      Phe Phe Arg His Pro Asn Ile Thr Thr Tyr Trp Thr Val Phe Thr Val
          115          120          125

30      Gly Ser Trp Leu Trp Val Ile Ser Pro Phe Met Ala Tyr Gly Ser Ala
          130          135          140

35      Ser Gln Leu Leu Arg Thr Tyr Phe Pro Glu Gly Met Ser Glu Thr Leu
          145          150          155          160

      Ile Arg Asn Ile Leu Phe Gly Ala Val Arg Gly Leu Asn Tyr Leu His
          165          170          175

40      Gln Asn Gly Cys Ile His Arg Ser Ile Lys Ala Ser His Ile Leu Ile
          180          185          190

      Ser Gly Asp Gly Leu Val Thr Leu Ser Gly Leu Ser His Leu His Ser
          195          200          205

45      Leu Val Lys His Gly Gln Arg His Arg Ala Val Tyr Asp Phe Pro Gln
          210          215          220

50      Phe Ser Thr Ser Val Gln Pro Trp Leu Ser Pro Glu Leu Leu Arg Gln
          225          230          235          240

      Asp Leu His Gly Tyr Asn Val Lys Ser Asp Ile Tyr Ser Val Gly Ile
          245          250          255

55      Thr Ala Cys Glu Leu Ala Ser Gly Gln Val Pro Phe Gln Asp Met His
          260          265          270

      Arg Thr Gln Met Leu Leu Gln Lys Leu Lys Gly Pro Pro Tyr Ser Pro
          275          280          285

60      Leu Asp Ile Ser Ile Phe Pro Gln Ser Glu Ser Arg Met Lys Asn Ser
          290          295          300

```

65

ES 2 308 198 T3

Gln Ser Gly Val Asp Ser Gly Ile Gly Glu Ser Val Leu Val Ser Ser
 305 310 315 320
 5 Gly Thr His Thr Val Asn Ser Asp Arg Leu His Thr Pro Ser Ser Lys
 325 330 335
 Thr Phe Ser Pro Ala Phe Phe Ser Leu Val Gln Leu Cys Leu Gln Gln
 340 345 350
 10 Asp Pro Glu Lys Arg Pro Ser Ala Ser Ser Leu Leu Ser His Val Phe
 355 360 365
 Phe Lys Gln Met Lys Glu Glu Ser Gln Asp Ser Ile Leu Ser Leu Leu
 370 375 380
 15 Pro Pro Ala Tyr Asn Lys Pro Ser Ile Ser Leu Pro Pro Val Leu Pro
 385 390 395 400
 Trp Thr Glu Pro Glu Cys Asp Phe Pro Asp Glu Lys Asp Ser Tyr Trp
 405 410 415
 20 Glu Phe

25 <210> 11
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 308 198 T3

<400> 11

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

<210> 12

65 <211> 337

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 12

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

<210> 13

<211> 338

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

ES 2 308 198 T3

<400> 13

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

<210> 14

<211> 636

65 <212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

ES 2 308 198 T3

<400> 14

Met Asp Ser Thr Thr Ser Leu Pro Asn Asn Val Leu Leu Lys Lys Ala
1 5 10 15

Arg Pro Ser Lys Ile Phe Ala Val Thr Ser Ala Asn Ala Leu Asn Val
20 25 30

Lys Thr Glu Pro Val Ile Phe Val Lys Ser Asp Asp Leu Asn Gln Ala
35 40 45

Asn Thr Pro Leu Thr Gly Ser Lys Phe Gly Thr His Leu Ala Cys Ile
50 55 60

Arg Thr Ser Cys Leu His Arg Thr Val Asn Ala Ser Asn Tyr Ser Thr
65 70 75 80

Met Ser Asp Gly Gly Leu Tyr Thr Ser Asp Glu Pro Cys Ser Ser Ala
85 90 95

Gln Ala Glu Phe Arg Leu Ala Ala His Trp Glu Ser Thr Phe Thr Arg
100 105 110

Thr Arg Glu Ile His Cys Asp Thr Gly Tyr Ser Ser Gln Ser Pro Pro
115 120 125

Glu Thr Thr Val Phe Ile Gln Lys Ser Arg Phe Pro Val Ala Glu Lys
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Glu Leu Lys Ser Phe Glu Ser Lys Lys Leu Val Gln
145 150 155 160

Lys Lys Ser Gly Asn Ala Ser Thr Pro Thr Arg Lys Leu Ala Ser Glu
165 170 175

Glu Lys Lys Ala Lys Asn Thr Ser Met Gly Gln Thr Pro Ser Lys Leu
180 185 190

Lys Ser Pro Lys Ala Leu Lys Met Val Lys Lys Glu Asn Glu Pro Ala
195 200 205

Ile Pro Pro Asn His Phe Glu Gly Lys Val Tyr Gly Tyr Leu Val Asp
210 215 220

Asp Met Ser Ala Ile Gly Ile Gln Pro Ile Leu Asp Lys Tyr Asn Glu
225 230 235 240

Asp Pro Glu Lys Phe Phe Lys Arg Phe Asp Ser Lys Pro Trp Phe Arg
245 250 255

Arg Lys Val Met Pro Leu Leu Phe Gly Lys Ser His Lys Ser Pro Ala
260 265 270

Asp Val Val Lys Thr Leu Arg Glu Val Leu Thr Ile Leu Asp Lys Leu
275 280 285

Pro Pro Pro Lys Leu Asp Lys Asp Gly Asn Ile Gln Ser Asp Lys Lys
290 295 300

Tyr Asp Lys Ala Leu Asp Glu Val Ser Lys Asn Val Ala Met Ile Lys
305 310 315 320

Ser Phe Ile Tyr Gly Asn Asp Ser Ala Glu Pro Ser Ser Glu His Val
325 330 335

Val Gln Val Ala Gln Leu Ala Gln Glu Val Tyr Asn Ala Asn Ile Leu
340 345 350

Pro Met Leu Ile Lys Met Leu Pro Lys Phe Glu Phe Glu Cys Lys Lys
355 360 365

Asp Val Gly Gln Ile Phe Asn Asn Leu Leu Arg Arg Gln Ile Gly Thr
370 375 380

ES 2 308 198 T3

Arg Ser Pro Thr Val Glu Tyr Leu Gly Ala Arg Pro Glu Ile Leu Ile
 385 390 395 400
 5 Gln Leu Val Gln Gly Tyr Ser Val Pro Asp Ile Ala Leu Thr Cys Gly
 405 410 415
 Leu Met Leu Arg Glu Ser Ile Arg His Asp His Leu Ala Lys Ile Ile
 420 425 430
 10 Leu Tyr Ser Asp Val Phe Tyr Thr Phe Phe Leu Tyr Val Gln Ser Glu
 435 440 445
 Val Phe Asp Ile Ser Ser Asp Ala Phe Ser Thr Phe Lys Glu Leu Thr
 450 455 460
 15 Thr Arg His Lys Ala Ile Ile Ala Glu Phe Leu Asp Ser Asn Tyr Asp
 465 470 475 480
 Thr Phe Phe Ala Gln Tyr Gln Asn Leu Leu Asn Ser Lys Asn Tyr Val
 485 490 495
 20 Thr Arg Arg Gln Ser Leu Lys Leu Leu Gly Glu Leu Leu Leu Asp Arg
 500 505 510
 His Asn Phe Asn Thr Met Thr Lys Tyr Ile Ser Asn Pro Asp Asn Leu
 515 520 525
 25 Arg Leu Met Met Glu Leu Leu Arg Asp Lys Ser Arg Asn Ile Gln Tyr
 530 535 540
 Glu Ala Phe His Val Phe Lys Val Phe Val Ala Asn Pro Asn Lys Pro
 545 550 555 560
 Lys Pro Ile Ser Asp Ile Leu Asn Arg Asn Arg Glu Lys Leu Val Glu
 565 570 575
 35 Phe Leu Ser Glu Phe His Asn Asp Arg Thr Asp Asp Glu Gln Phe Asn
 580 585 590
 Asp Glu Lys Ala Tyr Leu Ile Lys Gln Ile Gln Glu Met Lys Ser Ser
 595 600 605
 40 Pro Lys Glu Ala Lys Lys Pro Lys Ser Lys Glu Asp Glu Asn Gln Glu
 610 615 620
 Pro Ala Gly Pro Ser Glu Gly Pro Ser Thr Ser Gln
 625 630 635
 45

<210> 15

<211> 339

50 <212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

55

60

65

ES 2 308 198 T3

<400> 15

Met Pro Leu Phe Gly Lys Ser Gln Lys Ser Pro Val Glu Leu Val Lys
1 5 10 15

Ser Leu Lys Glu Ala Ile Asn Ala Leu Glu Ala Gly Asp Arg Lys Val
20 25 30

Glu Lys Ala Gln Glu Asp Val Ser Lys Asn Leu Val Ser Ile Lys Asn
35 40 45

Met Leu Tyr Gly Ser Ser Asp Ala Glu Pro Pro Ala Asp Tyr Val Val
50 55 60

Ala Gln Leu Ser Gln Glu Leu Tyr Asn Ser Asn Leu Leu Leu Leu Leu
65 70 75 80

Ile Gln Asn Leu His Arg Ile Asp Phe Glu Gly Lys Lys His Val Ala
85 90 95

Leu Ile Phe Asn Asn Val Leu Arg Arg Gln Ile Gly Thr Arg Ser Pro
100 105 110

Thr Val Glu Tyr Ile Cys Thr Lys Pro Glu Ile Leu Phe Thr Leu Met
115 120 125

Ala Gly Tyr Glu Asp Ala His Pro Glu Ile Ala Leu Asn Ser Gly Thr
130 135 140

Met Leu Arg Glu Cys Ala Arg Tyr Glu Ala Leu Ala Lys Ile Met Leu
145 150 155 160

His Ser Asp Glu Phe Phe Lys Phe Phe Arg Tyr Val Glu Val Ser Thr
165 170 175

Phe Asp Ile Ala Ser Asp Ala Phe Ser Thr Phe Lys Glu Leu Leu Thr
180 185 190

Arg His Lys Leu Leu Cys Ala Glu Phe Leu Asp Ala Asn Tyr Asp Lys
195 200 205

Phe Phe Ser Gln His Tyr Gln Arg Leu Leu Asn Ser Glu Asn Tyr Val
210 215 220

Thr Arg Arg Gln Ser Leu Lys Leu Leu Gly Glu Leu Leu Leu Asp Arg
225 230 235 240

His Asn Phe Thr Val Met Thr Arg Tyr Ile Ser Glu Pro Glu Asn Leu
245 250 255

Lys Leu Met Met Asn Met Leu Lys Glu Lys Ser Arg Asn Ile Gln Phe
260 265 270

Glu Ala Phe His Val Phe Lys Val Phe Val Ala Asn Pro Asn Lys Pro
275 280 285

Lys Pro Ile Leu Asp Ile Leu Leu Arg Asn Gln Thr Lys Leu Val Asp
290 295 300

Phe Leu Thr Asn Phe His Thr Asp Arg Ser Glu Asp Glu Gln Phe Asn
305 310 315 320

Asp Glu Lys Ala Tyr Leu Ile Lys Gln Ile Lys Glu Leu Lys Pro Leu
325 330 335

Pro Glu Ala

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

65 <213> Artificial

<220>

<223> sustrato de LKB1

ES 2 308 198 T3

<400> 16

5 Leu Ser Asn Leu Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro Leu Tyr
 20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LKB1 sustrato

<400> 17

20 Phe Gly Asn Phe Tyr Lys Ser Gly Glu Pro Leu Ser Thr Trp Cys Gly
 1 5 10 15
25 Ser Pro Pro Tyr
 20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sustrato de LKB1

<400> 18

40 Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys Gly
 1 5 10 15
45 Ser Pro Asn Tyr
 20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sustrato de LKB1

<400> 19

60 Met Ala Ser Leu Gln Val Gly Asp Ser Leu Leu Glu Thr Ser Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro His Tyr
 20

<210> 20

<211> 20

ES 2 308 198 T3

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> sustrato de LKB1

 <400> 20

 10 Phe Ser Asn Glu Phe Thr Val Gly Gly Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly
 1 5 10 15

 Ser Pro Pro Tyr
 20
 15
 <210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sustrato de LKB1
 25
 <400> 21

 Ala Lys Pro Lys Gly Asn Lys Asp Tyr His Leu Gln Thr Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 30
 Ser Leu Ala Tyr
 20
 35 <210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Sustrato de LKB1

 <400> 22
 45
 Leu Ser Asn Leu Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly
 1 5 10 15
 50
 Ser Pro Leu Tyr
 20

 <210> 23
 <211> 23
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> Sustrato de LKB1

 65

ES 2 308 198 T3

<400> 23

5 Leu Ser Asn Leu Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro Leu Tyr Arg Arg Arg
 20

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sustrato de LKB1

<400> 24

20 Ser Asn Leu Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly Ser
 1 5 10 15
 Pro Leu Tyr

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sustrato de LKB1

<400> 25

40 Ser Asn Leu Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly Ser
 1 5 10 15
 Pro Leu Tyr Arg Arg Arg
 20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sustrato de LKB1

<400> 26

55 Leu Ser Asn Leu Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly
 1 5 10 15
60 Ser Pro Leu Tyr
 20

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 308 198 T3

<220>

<223> Sustrato de LKB1

5 <400> 27

Leu Ser Asn Leu Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly
1 5 10 15

10 Ser Pro Leu Tyr Arg Arg Arg
20

<210> 28

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Sustrato de LKB1

<400> 28

25 Phe Gly Asn Phe Tyr Lys Ser Gly Glu Pro Leu Ser Thr Trp Cys Gly
1 5 10 15

30 Ser Pro Pro Tyr
20

<210> 29

<211> 23

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Sustrato de LKB1

<400> 29

45 Phe Gly Asn Phe Tyr Lys Ser Gly Glu Pro Leu Ser Thr Trp Cys Gly
1 5 10 15

Ser Pro Pro Tyr Arg Arg Arg
20

50 <210> 30
<211> 20

<212> PRT

55 <213> Artificial

<220>

<223> Sustrato de LKB1

60 <400> 30

Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys Gly
1 5 10 15

65 Ser Pro Asn Tyr
20

ES 2 308 198 T3

<210> 31

<211> 23

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Sustrato de LKB1

10 <400> 31

Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys Gly
1 5 10 15

15

Ser Pro Asn Tyr Arg Arg Arg
20

<210> 32

20 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Sustrato de LKB1

<400> 32

30

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

35

Ser Pro His Tyr
20

<210> 33

40 <211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> Sustrato de LKB1

<400> 33

50

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

Ser Pro His Tyr Arg Arg Arg
20

55

<210> 34

<211> 20

60 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sustrato de LKB1

65

ES 2 308 198 T3

<400> 34

5 Phe Ser Asn Glu Phe Thr Val Gly Gly Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly
1 5 10 15
Ser Pro Pro Tyr
20

10 <210> 35

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Sustrato de LKB1

20 <400> 35

25 Phe Ser Asn Glu Phe Thr Val Gly Gly Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly
1 5 10 15
Ser Pro Pro Tyr Arg Arg Arg
20

<210> 36

30 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Sustrato de LKB1

<400> 36

40 Ala Lys Pro Lys Gly Asn Lys Asp Tyr His Leu Gln Thr Cys Cys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Ala Tyr
20

<210> 37

<211> 23

50 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

55 <223> Sustrato de LKB1

<400> 37

60 Ala Lys Pro Lys Gly Asn Lys Asp Tyr His Leu Gln Thr Cys Cys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Ala Tyr Arg Arg Arg
20

65 <210> 38

<211> 19

ES 2 308 198 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 38

Met Val Ala Gly Leu Thr Leu Gly Lys Gly Pro Glu Ser Pro Asp Gly
1 5 10 15

10 Asp Val Ser

<210> 39

15 <211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 39

Leu Ser Trp Gly Ala Gly Leu Lys Gly Gln Lys Val Ala Thr Ser Tyr
1 5 10 15

25 Glu Ser Ser Leu
20

<210> 40

30 <211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 40

Met Glu Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala Gly Asp Arg Pro Asp Leu Gly
1 5 10 15

40 Leu Gly Ala Pro Gly
20

<210> 41

45 <211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 41

Thr Asp Cys Gln Glu Val Thr Ala Thr Tyr Arg Gln Ala Leu Arg Val
1 5 10 15

55 Cys Ser Lys Leu Thr
20

60 <210> 42

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 308 198 T3

<400> 42

Met Val Met Ala Asp Gly Pro Arg His Leu Gln Arg Gly Pro Val Arg
1 5 10 15

5 Val Gly Phe Tyr Asp
20

10 <210> 43
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 43

Met Val Ile Met Ser Glu Phe Ser Ala Asp Pro Ala Gly Gln Gly Gln
1 5 10 15

20 Gly Gln Gln Lys
20

25 <210> 44
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 44

Gly Asp Cys Glu Met Glu Asp Leu Met Pro Cys Ser Leu Gly Thr Phe
1 5 10 15

35 Val Leu Val Gln
20

40 <210> 45
<211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 45

Thr Asp Ile Leu Leu Ser Tyr Lys His Pro Glu Val Ser Phe Ser Met
1 5 10 15

50 Glu Gln Ala Gly Val
20

55 <210> 46
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 308 198 T3

<400> 46

5 Ser Gly Thr Ser Ile Ala Phe Lys Asn Ile Ala Ser Lys Ile Ala Asn
 1 5 10 15
 Glu Leu Lys Leu
 20

<210> 47

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

20 Met Ser Ser Arg Thr Val Leu Ala Pro Gly Asn Asp Arg Asn Ser Asp
 1 5 10 15
 Thr His Gly Thr
 20

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

35 Met Lys Asp Tyr Asp Glu Leu Leu Lys Tyr Tyr Glu Leu His Glu Thr
 1 5 10 15
 Ile Gly Thr Gly
 20

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

50 Cys Thr Ser Pro Pro Asp Ser Phe Leu Asp Asp His His Leu Thr Arg
 1 5 10 15

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

60 Cys Asp Pro Met Lys Arg Ala Thr Ile Lys Asp Ile Arg Glu
 1 5 10

<210> 51

<211> 12

ES 2 308 198 T3

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

5 <223> C-terminal 12 residuos STRAD alpha

<400> 51

10 Asn Leu Glu Glu Leu Glu Val Asp Asp Trp Glu Phe
1 5 10

<210> 52

15 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

²⁰ <223> C-terminal 12 residuos STRAD alpha, último residuo mutado a Ala

<400> 52

25 Asn Leu Glu Glu Leu Glu Val Asp Asp Trp Glu Ala
1 5 10

<210> 53

30 $\langle 210 \rangle$ 55
 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> Artificial

35 $\langle 220 \rangle$

<223> C-terminal 12 residuos STRAD alpha, último tercer residuo mutado a Ala

<400> 53

40
Asn Leu Glu Glu Leu Glu Val Asp Asp Ala Glu Phe
1 5 10

<210> 54

 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> Artificial

50 $\langle 220 \rangle$

<223> C-terminal 12 residuos STRAD alpha, último segundo residuo mutado a Ala

<400> 54

55

Asn Leu Glu Glu Leu Glu Val Asp Asp Trp Ala Phe
1 5 10

60 $\langle 210 \rangle$ 55

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

65 $\langle 213 \rangle$
 $\langle 220 \rangle$

<223> C-terminal 6 residuos STRAD alpha

ES 2 308 198 T3

<400> 55

Val Asp Asp Trp Glu Phe
1 5

5

<210> 56

<211> 547

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 56

15

Met Ala Glu Pro Ser Gly Ser Pro Val His Val Gln Leu Pro Gln Gln
1 5 10 15

20

Ala Ala Pro Val Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Thr
20 25 30

Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala
35 40 45

25

Pro Ala Pro Ala Ala Gln Ala Val Gly Trp Pro Ile Cys Arg Asp Ala
50 55 60

Tyr Glu Leu Gln Glu Val Ile Gly Ser Gly Ala Thr Ala Val Val Gln
65 70 75 80

30

Ala Ala Leu Cys Lys Pro Arg Gln Glu Arg Val Ala Ile Lys Arg Ile
85 90 95

Asn Leu Glu Lys Cys Gln Thr Ser Met Asp Glu Leu Leu Lys Glu Ile
100 105 110

35

Gln Ala Met Ser Gln Cys Ser His Pro Asn Val Val Thr Tyr Tyr Thr
115 120 125

Ser Phe Val Val Lys Asp Glu Leu Trp Leu Val Met Lys Leu Leu Ser
130 135 140

40

Gly Gly Ser Met Leu Asp Ile Ile Lys Tyr Ile Val Asn Arg Gly Glu
145 150 155 160

His Lys Asn Gly Val Leu Glu Glu Ala Ile Ile Ala Thr Ile Leu Lys
165 170 175

45

Glu Val Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Leu His Arg Asn Gly Gln Ile His
180 185 190

Arg Asp Leu Lys Ala Gly Asn Ile Leu Leu Gly Glu Asp Gly Ser Val

50

55

60

65

ES 2 308 198 T3

	195	200	205
	Gln Ile Ala Asp Phe Gly Val 210 215	Ser Ala Phe Leu Ala Thr Gly Gly Asp 220	
5	Val Thr Arg Asn Lys Val 225 230	Arg Lys Thr Phe Val 235	Gly Thr Pro Cys Trp 240
	Met Ala Pro Glu Val 245	Met Glu Gln Val 250	Arg Gly Tyr Asp Phe Lys Ala 255
10	Asp Met Trp Ser Phe Gly Ile Thr 260 265	Ala Ile Glu Leu Ala Thr Gly Ala 270	
	Ala Pro Tyr His Lys Tyr Pro 275 280	Pro Met Lys Val Leu Met Leu Thr Leu 285	
15	Gln Asn Asp Pro Pro Thr 290 295	Leu Glu Thr Gly Val 300	Glu Asp Lys Glu Met
	Met Lys Lys Tyr Gly 305 310	Lys Ser Phe Arg Lys 315	Leu Leu Ser Leu Cys Leu 320
20	Gln Lys Asp Pro Ser Lys Arg Pro Thr 325 330	Ala Ala Glu Leu Leu Lys Cys 335	
	Lys Phe Phe Gln Lys Ala Lys Asn Arg 340 345	Glu Tyr Leu Ile Glu Lys Leu 350	
25	Leu Thr Arg Thr Pro Asp Ile 355 360	Ala Gln Arg Ala Lys Lys Val Arg Arg 365	
	Val Pro Gly Ser Ser Gly His 370 375	Leu His Lys Thr Glu Asp Gly Asp Trp 380	
30	Glu Trp Ser Asp Asp Glu Met 385 390	Asp Glu Lys Ser Glu Glu Gly Lys Ala 395 400	
	Ala Phe Ser Gln Glu Lys Ser Arg Arg 405 410	Val Lys Glu Glu Asn Pro Glu 415	
35	Ile Ala Val Ser Ala Ser Thr Ile 420 425	Pro Glu Gln Ile Gln Ser Leu Ser 430	
	Val His Asp Ser Gln Gly Pro 435 440	Pro Asn Ala Asn Glu Asp Tyr Arg Glu 445	
40	Ala Ser Ser Cys Ala Val 450 455	Asn Leu Val Leu Arg Leu Arg Asn Ser Arg 460	
	Lys Glu Leu Asn Asp Ile Arg Phe Glu Phe Thr 465 470 475 480	Pro Gly Arg Asp Thr	
45	Ala Asp Gly Val Ser Gln Glu Leu Phe 485 490	Ser Ala Gly Leu Val Asp Gly 495	
50	His Asp Val Val Ile Val Ala Ala 500 505	Asn Leu Gln Lys Ile Val Asp Asp 510	
	Pro Lys Ala Leu Lys Thr Leu Thr 515 520	Phe Lys Leu Ala Ser Gly Cys Asp 525	
55	Gly Ser Glu Ile Pro Asp Glu Val 530 535	Lys Leu Ile Gly Phe Ala Gln Leu 540	
60	Ser Val Ser 545		

<210> 57

<211> 527

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 57

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

ES 2 308 198 T3

Thr Ala Gln Ala Leu Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gln Glu Thr Lys Ile
 420 425 430
 Pro Ile Ser Leu Val Leu Arg Leu Arg Asn Ser Lys Lys Glu Leu Asn
 435 440 445
 Asp Ile Arg Phe Glu Phe Thr Pro Gly Arg Asp Thr Ala Glu Gly Val
 450 455 460
 Ser Gln Glu Leu Ile Ser Ala Gly Leu Val Asp Gly Arg Asp Leu Val
 465 470 475 480
 Ile Val Ala Ala Asn Leu Gln Lys Ile Val Glu Glu Pro Gln Ser Asn
 485 490 495
 Arg Ser Val Thr Phe Lys Leu Ala Ser Gly Val Glu Gly Ser Asp Ile
 500 505 510
 Pro Asp Asp Gly Lys Leu Ile Gly Phe Ala Gln Leu Ser Ile Ser
 515 520 525

<210> 58

<211> 560

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 58

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

ES 2 308 198 T3

5 Lys Leu Pro Phe Asn Ala Asn Ser Gly Leu Glu Leu Phe Asp Ser Ile
 275 280 285
 Ile Asn Lys Pro Leu Glu Phe Pro Ser Tyr Glu Glu Met Leu Asn Gly
 290 295 300
 Ala Thr Ser Gly Ile Thr Met Glu Glu Tyr Thr Asp Ala Lys Asp Leu
 305 310 315 320
 Leu Lys Lys Leu Leu Gln Lys Asp Pro Asp Lys Arg Ile Lys Leu Ala
 325 330 335
 10 Asp Ile Lys Val His Pro Phe Met Cys His Tyr Gly Lys Ser Asp Ala
 340 345 350
 Ala Ser Val Leu Thr Asn Leu Glu Thr Phe His Glu Leu Lys Val Ser
 355 360 365
 15 Pro Pro Ser Ser Cys Lys Arg Val Glu Leu Val Ser Leu Pro Val Asn
 370 375 380
 Ser Ser Phe Ala Ser Leu Asp Ser Val Tyr Met Glu Asn Phe Asp His
 385 390 395 400
 20 Asn Asn Leu Arg Thr Gly Ala Asp Arg Asn Ser Thr Tyr Ser Pro Ser
 405 410 415
 Ile Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Ser Pro Ser Ala Tyr His Asn Ile Gly
 420 425 430
 Ser Arg Glu Ser Ser Tyr Ser Ser Phe Ser Ser Phe Thr Ser Ser Thr
 435 440 445
 25 Ala Phe Ala Ser Gln Ile Ser Ile Gln Asp Ala Pro Ala Ile Gly Asp
 450 455 460
 Gln Gln Cys Leu Ile Gly Glu Ser Gly Ser Ser Leu Arg Val Asn Ser
 465 470 475 480
 30 Cys Glu Phe Pro Gln Tyr Thr Thr Met Ser Pro Val Gly Glu Tyr Pro
 485 490 495
 Phe Glu Ser Thr Glu Ala Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Pro Val Gly
 500 505 510
 35 Asn Val Pro Gln Arg Ile Lys Ala His Leu Val Glu Gly Lys Ser Asn
 515 520 525
 Ser Lys Asp Asp Leu Arg Ile Glu Ala Asp Ala Ser Leu Val Phe Glu
 530 535 540
 40 Ala Ser Asp Ala Gln Arg Thr Arg Arg Arg Met Ser Leu Tyr Lys Leu
 545 550 555 560

<210> 59

45 <211> 1142

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

50 <400> 59

55 Met Asp Arg Ser Asp Lys Lys Val Asn Val Glu Glu Val Asn Val Pro
 1 5 10 15
 Ser Asn Leu Gln Ile Glu Leu Glu Lys Ser Gly Thr Ser Ser Val
 20 25 30
 Ser Leu Arg Ser Pro Thr Lys Ser Ser Ala Thr Asn Leu Ala Gly Met
 35 40 45
 60 Ala Glu Gly Ala Arg Asp Asn Ala Ser Ile Ala Ser Ser Val Asp
 50 55 60
 Ser Leu Asn Met Leu Leu Glu Arg Gln Arg Val Arg Gln Leu Asn His
 65 70 75 80
 Pro Gln His Gln Gln His Ile Ser Ser Ser Leu Ala Lys Thr Pro Thr
 85 90 95

65

ES 2 308 198 T3

Thr Thr Ser Ser Phe Cys Ser Ser Gly Ser Ser Lys Asn Lys Val Lys
 100 105 110
 Glu Thr Asn Arg Ile Ser Leu Thr Tyr Asp Pro Val Ser Lys Arg Lys
 115 120 125
 Val Leu Asn Thr Tyr Glu Ile Ile Lys Glu Leu Gly His Gly Gln His
 130 135 140
 Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg Asp Ile Leu Ser Lys Gln Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ile Lys Ile Val Asp Arg His Glu Lys Lys Gln Arg Lys Phe Phe Thr
 165 170 175
 Phe Ile Lys Ser Ser Lys Ile Ser Glu Asn Asp Lys Ile Lys Arg Glu
 180 185 190
 Ile Ala Ile Met Lys Lys Cys His His Lys His Val Val Gln Leu Ile
 195 200 205
 Glu Val Leu Asp Asp Leu Lys Ser Arg Lys Ile Tyr Leu Val Leu Glu
 210 215 220
 Tyr Cys Ser Arg Gly Glu Val Lys Trp Cys Pro Pro Asp Cys Met Glu
 225 230 235 240
 Ser Asp Ala Lys Gly Pro Ser Leu Leu Ser Phe Gln Glu Thr Arg Glu
 245 250 255
 Ile Leu Arg Gly Val Val Leu Gly Leu Glu Tyr Leu His Tyr Gln Gly
 260 265 270
 Ile Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Ala Asn Leu Leu Ile Ser Gly Asp
 275 280 285
 Gly Thr Val Lys Ile Ser Asp Phe Gly Val Ser Leu Ala Ala Ser Ser
 290 295 300
 Thr Asn Ser Ser Asp Ser Ser Glu Ser Leu Asp Glu Leu Glu Leu Ala
 305 310 315 320
 Lys Thr Val Gly Thr Pro Ala Phe Phe Ala Pro Glu Met Cys Leu Gly
 325 330 335
 Glu Asp Ala Phe Thr Arg Tyr Asn Leu Thr Lys Glu Asn Leu Phe Arg
 340 345 350
 Gly Ser Cys Ile Ser Phe Met Ile Asp Ile Trp Ala Val Gly Val Thr
 355 360 365
 Leu Tyr Cys Leu Leu Phe Gly Met Leu Pro Phe Phe Ser Asp Phe Glu
 370 375 380
 Leu Lys Leu Phe Glu Lys Ile Val Asn Asp Pro Leu Lys Phe Pro Thr
 385 390 395 400
 Phe Lys Glu Ile Gln Ser Asn Lys Val Ser Lys Val Ser Cys Glu Glu
 405 410 415
 Glu Tyr Glu Met Ala Lys Asp Leu Leu Leu Lys Leu Leu Glu Lys Asn
 420 425 430
 Pro Gln Lys Arg Met Thr Ile Pro Ala Ile Lys Lys His Pro Phe Val
 435 440 445
 Ser Trp Asp Phe Asp His Val Pro Glu Asn Asp Glu Lys Leu Leu Ser
 450 455 460
 Ser Val Leu Glu Gln Lys Leu Arg Phe Gln Cys Asn Gln Thr Asp Gln
 465 470 475 480
 Phe Glu Pro Ile Ser Ile Ser Lys His Glu Leu Lys Asn Ala Val Ser
 485 490 495
 Gly Val Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ser Val Leu Lys Ser Ile Pro Leu
 500 505 510

ES 2 308 198 T3

Lys Asp Pro Ser Asp Leu Ser Asn Lys Asn Tyr Leu His Pro Thr Glu
 515 520 525
 5 Thr Thr Arg Gly Arg Gly Asp Ala Asn Val Ile Val Ser Glu Gly Ser
 530 535 540
 Val Leu Ser Asn Ile Lys Glu Leu Ser Ala Asn Asp Gly Cys Leu Asn
 545 550 555 560
 10 Thr Asp Ser Asp Thr Asn Ile Asn Ile Asn Asp Asp Asp His Tyr Ser
 565 570 575
 Gly Asp Asp Asn Asp Gly His Leu Thr Lys Arg Glu Leu Glu Arg Glu
 580 585 590
 15 Leu Asn Lys Phe Asp Asp Lys His Glu Ala Gly Asn Met Val Asn Leu
 595 600 605
 Pro Ile Asn Ser Ser Phe Ala Ser Leu Asp Ser Phe Tyr Ile Asp Asn
 610 615 620
 20 Phe Ala Met Ala Arg Met Gly Met Ser Ser Pro Glu Ala Gly Asp Ser
 625 630 635 640
 Val Ser Ser Val Pro Asn Leu Pro Ser Ala Pro Ser Ser Thr Arg Leu
 645 650 655
 25 Gly Arg Ser Pro Val Phe Ser Gly Val Thr Asn Gln Pro Ser Pro Ile
 660 665 670
 Arg Pro Val Leu Pro Gln Gln Lys Ser Ser Phe Cys Ala Thr Gly Arg
 675 680 685
 30 Tyr Asp Lys Ser His Asn Ser Leu Leu Arg Asn Ser Ser Ser His Leu
 690 695 700
 Thr Ser Tyr Asn Ser Gly Arg Pro Ser Ser Arg Thr Gly Arg Met Asr
 705 710 715 720
 35 Ser Arg Asn Gln Asn Leu Pro Lys Ile Pro Asn Ser Leu Ser Lys Ile
 725 730 735
 40 Ser Thr Thr Lys Leu Thr Glu Leu Arg Val Pro Lys Asp Ser Glu Ile
 740 745 750
 Pro Ser Pro Ala Lys Asn Pro Asn Ala Asp Arg Leu Arg Arg Phe Pro
 755 760 765
 45 Val Lys Lys Asn Thr Lys Thr Pro Ala Ile Lys Asp Pro Pro Arg Ile
 770 775 780
 Asn Ile Asn Ser Ser Asp Lys Ser Gly Ser Lys Asn Ser Pro Ile Lys
 785 790 795 800
 50 Ser Leu Tyr Gln Arg Met Lys Gln Ser Lys Asp Asn Ser Lys Thr Phe
 805 810 815
 Glu Val Arg Arg Gly Asn Phe Phe Ser His Phe Asn Gly Asp Asp Asp
 820 825 830
 55 Asp Ser Ser Ser Gln Ser Ser Val Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ser Asp
 835 840 845
 Ser Glu Leu Ser Ser Thr Ser Ser Ser Cys Thr Ser Gly Thr Gln Ser
 850 855 860
 60 Arg Asn Ser Ser Asn Asn Asn Ala Tyr Ser Glu Thr Glu Ser Leu Pro
 865 870 875 880
 Phe Glu Phe Gly Val Asp Ser Glu Asp Gly Ser Gly Val Leu Leu Arg
 885 890 895
 65 Asp Leu Pro Asn Glu Asp Gln Ile Arg Pro Phe Leu Asp Ile Gln Pro
 900 905 910

ES 2 308 198 T3

Cys Arg Arg Met Lys Val Lys Ser Ser Leu Asn Leu Glu Pro Pro Ser
 915 920 925
 Val Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Glu Asp Glu Leu Ile Leu
 930 935 940
 Asn Val Gly Thr Ala Gly His Arg Arg Arg His Asn Ser Ser Lys Leu
 945 950 955 960
 Ser Glu Leu Ser Asn Ser Pro Gln Lys Gly Ser Asn Asn Phe Met Tyr
 965 970 975
 Ser Asn Gly Ser Val His Asp Ser Glu Thr Thr Ile Thr Pro Gln Asn
 980 985 990
 Met Asp Asp Leu Thr Leu His Gln Ala Leu Ser Arg Ser Gln Pro Ile
 995 1000 1005
 Ser Lys Pro Gly Pro Leu Val Leu Pro Lys Arg Leu Asp Gln Lys
 1010 1015 1020
 Lys Ala Thr Thr Glu Thr Ser Asn Leu Thr Asp Ile Val Glu Phe
 1025 1030 1035
 Asn Gly Asn Asn Asp His Arg Lys Asp Lys Asn Phe Asp Lys Val
 1040 1045 1050
 Leu Tyr Ser Arg Asp Leu Leu Lys Asp Ala Leu Ser Ser Thr Asn
 1055 1060 1065
 Ala Gly Arg Arg Arg Ser Ile Pro Ser Asn Lys Ile Arg Gly Arg
 1070 1075 1080
 Lys Asp Ala Ser Ile Thr Met Ser Thr Asn Val Gly Asn Asp Glu
 1085 1090 1095
 His Ala Arg Asn Thr Ser Cys His Gly Asp Lys Gly Gln Glu Asn
 1100 1105 1110
 Gly Ala Ile Lys Gln Arg Thr His Glu Arg Ser Arg Ser Leu Thr
 1115 1120 1125
 Val Ala Glu Leu Asn Glu Glu Lys Arg Arg Ser Ala Leu Pro
 1130 1135 1140

40 <210> 60
 <211> 640
 <212> PRT
 45 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 60

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

ES 2 308 198 T3

Tyr Ser Val Asn Gln Val Met Arg Gln Ile Gln Leu Trp Lys Ser Lys
 130 135 140
 Gly Lys Ile Thr Thr Asn Met Ser Gly Asn Glu Ala Met Arg Leu Met
 145 150 155 160
 Asn Ile Glu Lys Cys Arg Trp Glu Ile Phe Ala Ala Ser Arg Leu Arg
 165 170 175
 Asn Asn Val His Ile Val Arg Leu Ile Glu Cys Leu Asp Ser Pro Phe
 180 185 190
 Ser Glu Ser Ile Trp Ile Val Thr Asn Trp Cys Ser Leu Gly Glu Leu
 195 200 205
 Gln Trp Lys Arg Asp Asp Asp Glu Asp Ile Leu Pro Gln Trp Lys Lys
 210 215 220
 Ile Val Ile Ser Asn Cys Ser Val Ser Thr Phe Ala Lys Lys Ile Leu
 225 230 235 240
 Glu Asp Met Thr Lys Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Cys Ile
 245 250 255
 His Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Ile Leu Leu Asp Glu Glu Glu Lys
 260 265 270
 Val Ala Lys Leu Ser Asp Phe Gly Ser Cys Ile Phe Thr Pro Gln Ser
 275 280 285
 Leu Pro Phe Ser Asp Ala Asn Phe Glu Asp Cys Phe Gln Arg Glu Leu
 290 295 300
 Asn Lys Ile Val Gly Thr Pro Ala Phe Ile Ala Pro Glu Leu Cys His
 305 310 315 320
 Leu Gly Asn Ser Lys Arg Asp Phe Val Thr Asp Gly Phe Lys Leu Asp
 325 330 335
 Ile Trp Ser Leu Gly Val Thr Leu Tyr Cys Leu Leu Tyr Asn Glu Leu
 340 345 350
 Pro Phe Phe Gly Glu Asn Glu Phe Glu Thr Tyr His Lys Ile Ile Glu
 355 360 365
 Val Ser Leu Ser Ser Lys Ile Asn Gly Asn Thr Leu Asn Asp Leu Val
 370 375 380
 Ile Lys Arg Leu Leu Glu Lys Asp Val Thr Leu Arg Ile Ser Ile Gln
 385 390 395 400
 Asp Leu Val Lys Val Leu Ser Arg Asp Gln Pro Ile Asp Ser Arg Asn
 405 410 415
 His Ser Gln Ile Ser Ser Ser Ser Val Asn Pro Val Arg Asn Glu Gly
 420 425 430
 Pro Val Arg Arg Phe Phe Gly Arg Leu Leu Thr Lys Lys Gly Lys Lys
 435 440 445
 Lys Thr Ser Gly Lys Gly Lys Asp Lys Val Leu Val Ser Ala Thr Ser
 450 455 460
 Lys Val Thr Pro Ser Ile His Ile Asp Glu Glu Pro Asp Lys Glu Cys
 465 470 475 480
 Phe Ser Thr Thr Val Leu Arg Ser Ser Pro Asp Ser Ser Asp Tyr Cys
 485 490 495
 Ser Ser Leu Gly Glu Glu Ala Ile Gln Val Thr Asp Phe Leu Asp Thr
 500 505 510
 Phe Cys Arg Ser Asn Glu Ser Leu Pro Asn Leu Thr Val Asn Asn Asp
 515 520 525
 Lys Gln Asn Ser Asp Met Lys Thr Asp Arg Ser Glu Ser Ser Ser His
 530 535 540
 Ser Ser Leu Lys Ile Pro Thr Pro Ile Lys Ala Met Ile Arg Leu Lys

ES 2 308 198 T3

545 550 555 560
 Ser Ser Pro Lys Glu Asn Gly Asn Arg Thr His Ile Asn Cys Ser Gln
 565 570 575
 5 Asp Lys Pro Ser Ser Pro Leu Met Asp Arg Thr Val Gly Lys Arg Thr
 580 585 590
 Val Asn Asn Ser Gly Ala Arg Lys Leu Ala His Ser Ser Asn Ile Leu
 595 600 605
 10 Asn Phe Lys Ala Tyr Ile Asn Ser Glu Asp Ser Asp Ile Arg Glu Thr
 610 615 620
 Val Glu Asp Val Lys Thr Tyr Leu Asn Phe Ala Asp Asn Gly Gln Ile
 625 630 635 640
 15 <210> 61
 <211> 545
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 61
 Met Ser Ser Cys Val Ser Ser Gln Pro Ser Ser Asn Arg Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 25 Gln Asp Glu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Ser Ser Ser Glu Ser Gln Lys
 20 25 30
 Pro Cys Glu Ala Leu Arg Gly Leu Ser Ser Leu Ser Ile His Leu Gly
 35 40 45
 30 Met Glu Ser Phe Ile Val Val Thr Glu Cys Glu Pro Gly Cys Ala Val
 50 55 60
 Asp Leu Gly Leu Ala Arg Asp Arg Pro Leu Glu Ala Asp Gly Gln Glu
 65 70 75 80
 35 Val Pro Leu Asp Thr Ser Gly Ser Gln Ala Arg Pro His Leu Ser Gly
 85 90 95
 Arg Lys Leu Ser Leu Gln Glu Arg Ser Gln Gly Gly Leu Ala Ala Gly
 100 105 110
 40 Gly Ser Leu Asp Met Asn Gly Arg Cys Ile Cys Pro Ser Leu Pro Tyr
 115 120 125
 Ser Pro Val Ser Ser Pro Gln Ser Ser Pro Arg Leu Pro Arg Arg Pro
 130 135 140
 45 Thr Val Glu Ser His His Val Ser Ile Thr Gly Met Gln Asp Cys Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Asn Gln Tyr Thr Leu Lys Asp Glu Ile Gly Lys Gly Ser Tyr
 165 170 175
 50 Gly Val Val Lys Leu Ala Tyr Asn Glu Asn Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala
 180 185 190
 Met Lys Val Leu Ser Lys Lys Lys Leu Ile Arg Gln Ala Gly Phe Pro
 195 200 205
 55 Arg Arg Pro Pro Pro Arg Gly Thr Arg Pro Ala Pro Gly Gly Cys Ile
 210 215 220
 Gln Pro Arg Gly Pro Ile Glu Gln Val Tyr Gln Glu Ile Ala Ile Leu
 225 230 235 240
 60 Lys Lys Leu Asp His Pro Asn Val Val Lys Leu Val Glu Val Leu Asp
 245 250 255
 Asp Pro Asn Glu Asp His Leu Tyr Met Val Phe Glu Leu Val Asn Gln
 260 265 270
 65 Gly Pro Val Met Glu Val Pro Thr Leu Lys Pro Leu Ser Glu Asp Gln
 275 280 285

ES 2 308 198 T3

Ala Arg Phe Tyr Phe Gln Asp Leu Ile Lys Gly Ile Glu Tyr Leu His
290 295 300

5 Tyr Gln Lys Ile Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Leu Leu Val
305 310 315 320

Gly Glu Asp Gly His Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Val Ser Asn Glu
325 330 335

10 Phe Lys Gly Ser Asp Ala Leu Leu Ser Asn Thr Val Gly Thr Pro Ala
340 345 350

Phe Met Ala Pro Glu Ser Leu Ser Glu Thr Arg Lys Ile Phe Ser Gly
355 360 365

15 Lys Ala Leu Asp Val Trp Ala Met Gly Val Thr Leu Tyr Cys Phe Val
370 375 380

Phe Gly Gln Cys Pro Phe Met Asp Glu Arg Ile Met Cys Leu His Ser
385 390 395 400

20 Lys Ile Lys Ser Gln Ala Leu Glu Phe Pro Asp Gln Pro Asp Ile Ala
405 410 415

Glu Asp Leu Lys Asp Leu Ile Thr Arg Met Leu Asp Lys Asn Pro Glu
420 425 430

25 Ser Arg Ile Val Val Pro Glu Ile Lys Ile Leu Val Lys Thr Met Ile
435 440 445

Arg Lys Arg Ser Phe Gly Asn Pro Phe Glu Gly Ser Arg Arg Glu Glu
450 455 460

30 Arg Ser Leu Ser Ala Pro Gly Asn Leu Leu Thr Lys Lys Pro Thr Arg
465 470 475 480

Glu Cys Glu Ser Leu Ser Glu Leu Lys Glu Ala Arg Gln Arg Arg Gln
485 490 495

35 Pro Pro Gly His Arg Pro Ala Pro Arg Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu
500 505 510

40 Val Arg Gly Ser Pro Cys Val Glu Ser Cys Trp Ala Pro Ala Pro Gly
515 520 525

Ser Pro Ala Arg Met His Pro Leu Arg Pro Glu Glu Ala Met Glu Pro
530 535 540

45 Glu
545

50 <210> 62
<211> 243
<212> PRT
55 <213> Artificial
<220>
<223> Consenso para la figura 12

60

65

ES 2 308 198 T3

<400> 62

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

<210> 63

<211> 25

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 63

55 Asp Phe Gly Phe Ala Lys Arg Val Lys Gly Arg Thr Trp Thr Leu Cys
1 5 10 15
Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu
20 25
60

<210> 64

<211> 28

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 64

5 Asp Phe Gly Met Cys Lys Glu His Met Met Asp Gly Val Thr Thr Arg
1 5 10 15
Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala Pro Glu
20 25

10 <210> 65
<211> 27
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

20 Asp Phe Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Lys Asp Lys Phe Leu Gln Thr
1 5 10 15
Phe Cys Gly Ser Pro Leu Tyr Ala Ser Pro Glu
20 25

25 <210> 66
<211> 26
<212> PRT
26 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

35 Asp Phe Gly Leu Ser Asn Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe
1 5 10 15
Cys Gly Ser Pro Leu Tyr Ala Ser Pro Glu
20 25

40 <210> 67
 <211> 27
 <212> PRT
 45 <213> *Homo sapiens*

<400> 67

50 Asp Phe Gly Met Ala Ser Leu Gln Val Gly Asp Ser Leu Leu Glu Thr
1 5 10 15
Ser Cys Gly Ser Pro His Tyr Ala Cys Pro Glu
20 25

55 <210> 68
 <211> 27
 <212> PRT
 60 <213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 68

Asp Phe Gly Met Ala Ser Leu Gln Val Gly Asp Ser Leu Leu Glu Thr
1 5 10 15

Ser Cys Gly Ser Pro His Tyr Ala Cys Pro Glu
20 25

<210> 69

<211> 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 69

Asp Phe Gly Phe Gly Asn Phe Tyr Lys Ser Gly Glu Pro Leu Ser Thr
1 5 10 15

Trp Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

<210> 70

<211> 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 70

Asp Phe Gly Phe Gly Asn Phe Phe Lys Ser Gly Glu Leu Leu Ala Thr
1 5 10 15

Trp Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

<210> 71

<211> 27

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 71

Asp Phe Gly Leu Ser Asn Ile Met Arg Asp Gly His Phe Leu Lys Thr
1 5 10 15

Ser Cys Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

<210> 72

<211> 27

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 308 198 T3

<400> 72

5 Asp Phe Gly Leu Ser Asn Val Met Arg Asp Gly His Phe Leu Lys Thr
1 5 10 15
Ser Cys Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

<210> 73

<211> 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 73

20 Asp Phe Gly Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr
1 5 10 15
Ser Cys Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

<210> 74

<211> 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 74

Asp Phe Gly Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr
1 5 10 15

Ser Cys Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

<210> 75

<211> 27

<212> PRT

<213> saccharomyces cerevisiae

<400> 75

50 Asp Phe Gly Leu Ser Asn Ile Met Thr Asp Gly Asn Phe Leu Lys Thr
1 5 10 15
Ser Cys Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

<210> 76

<211> 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 76

5 Asp Phe Gly Phe Ser Asn Leu Phe Thr Pro Gly Gln Leu Leu Lys Thr
1 5 10
Trp Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

10 <210> 77

<211> 29

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 $\langle 213 \rangle$ 110°
 $\langle 400 \rangle$ 77°

20 Asp Phe Gly Leu Cys Ala Lys Pro Lys Gly Asn Lys Asp Tyr His Leu
1 5 10 15
Gln Thr Cys Cys Gly Ser Leu Ala Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

25 $\langle 210 \rangle$ 78

<211> 21

<212> PRT

20 <213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> consenso para la figura 19

35 <400> 78

40 Asp Phe Gly Leu Ser Asn Leu Gly Phe Leu Thr Ser Cys Gly Ser Pro
1 5 10 15
Tyr Ala Ala Pro Glu
20

<210> 79

45 $\langle 211 \rangle$ 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 79

55 Asp Phe Gly Phe Ser Asn Glu Phe Thr Val Gly Asn Lys Leu Asp Thr
1 5 10 15
Phe Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

<210> 80

<211> 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 80

5 Asp Phe Gly Phe Ser Asn Glu Phe Thr Val Gly Asn Lys Leu Asp Thr
1 5 10 15
Phe Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

10 <210> 81
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 81

20 Asp Phe Gly Phe Ser Asn Glu Phe Thr Val Gly Gly Lys Leu Asp Thr
1 5 10 15

Phe Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro Glu
20 25

25	<210> 82
	<211> 27
	<212> PRT
30	<213> <i>Homo sapiens</i>
	<400> 82

35 Asp Phe Gly Phe Ser Asn Glu Phe Thr Leu Gly Ser Lys Leu Asp Thr
1 5 10 15
Phe Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro Glu
40
20 25

45	<210> 83
	<211> 23
	<212> PRT
	<213> <i>Homo sapiens</i>
50	<400> 83

55 Leu Ser Asn Leu Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro Leu Tyr Arg Arg Arg
 20

60 <210> 84
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 84

5 Phe Gly Asn Phe Tyr Lys Ser Gly Glu Pro Leu Ser Thr Trp Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro Pro Tyr Arg Arg Arg
 20

10 <210> 85

<211> 23

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 85

20 Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro Asn Tyr Arg Arg Arg
 20

25 <210> 86

<211> 23

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 86

35 Met Ala Ser Leu Gln Val Gly Asp Ser Leu Leu Glu Thr Ser Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro His Tyr Arg Arg Arg
 20

40 <210> 87

<211> 23

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 87

50 Phe Ser Asn Glu Phe Thr Val Gly Gly Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro Pro Tyr Arg Arg Arg
 20

55 <210> 88

<211> 23

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 308 198 T3

<400> 88

5 Ala Lys Pro Lys Gly Asn Lys Asp Tyr His Leu Gln Thr Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ala Tyr Arg Arg Arg
 20

10 <210> 89

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 89

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

25 <210> 90

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 90

35 Ser Leu Gln Val Gly Asp Ser Leu Leu Glu Thr Ser Cys Gly Ser Pro
 1 5 10 15
 His Tyr Ala Cys Pro Glu Val Ile Arg
 20 25

40 <210> 91

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 91

50 Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly Ser Pro Leu Tyr Ala Ser Pro Glu Ile
 1 5 10 15
 Val Asn Gly Lys
 20

55

<210> 92

<211> 19

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 308 198 T3

<400> 92

5 Leu Asp Thr Phe Cys Gly Ser Pro Pro Tyr Ala Ala Pro Glu Leu Phe
 1 5 10 15
 Gln Gly Lys

<210> 93

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 93

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

<210> 94

<211> 329

<212> PRT

<213> *Schizosaccharomyces pombe*

<400> 94

35 Met Ser Phe Leu Phe Asn Lys Arg Pro Lys Ser Thr Gln Asp Val Val
 1 5 10 15
 Arg Cys Leu Cys Asp Asn Leu Pro Lys Leu Glu Ile Asn Asn Asp Lys
 20 25 30
40 Lys Lys Ser Phe Glu Glu Val Ser Lys Cys Leu Gln Asn Leu Arg Val
 35 40 45
 Ser Leu Cys Gly Thr Ala Glu Val Glu Pro Asp Ala Asp Leu Val Ser
 50 55 60

ES 2 308 198 T3

Asp Leu Ser Phe Gln Ile Tyr Gln Ser Asn Leu Pro Phe Leu Leu Val
 65 70 75 80
 Arg Tyr Leu Pro Lys Leu Glu Phe Glu Ser Lys Lys Asp Thr Gly Leu
 85 90 95
 Ile Phe Ser Ala Leu Leu Arg Arg His Val Ala Ser Arg Tyr Pro Thr
 100 105 110
 Val Asp Tyr Met Leu Ala His Pro Gln Ile Phe Pro Val Leu Val Ser
 115 120 125
 Tyr Tyr Arg Tyr Gln Glu Val Ala Phe Thr Ala Gly Ser Ile Leu Arg
 130 135 140
 Glu Cys Ser Arg His Glu Ala Leu Asn Glu Val Leu Leu Asn Ser Arg
 145 150 155 160
 Asp Phe Trp Thr Phe Phe Ser Leu Ile Gln Ala Ser Ser Phe Asp Met
 165 170 175
 Ala Ser Asp Ala Phe Ser Thr Phe Lys Ser Ile Leu Leu Asn His Lys
 180 185 190
 Ser Gln Val Ala Glu Phe Ile Ser Tyr His Phe Asp Glu Phe Phe Lys
 195 200 205
 Gln Tyr Thr Val Leu Leu Lys Ser Glu Asn Tyr Val Thr Lys Arg Gln
 210 215 220
 Ser Leu Lys Leu Leu Gly Glu Ile Leu Leu Asn Arg Ala Asn Arg Ser
 225 230 235 240
 Val Met Thr Arg Tyr Ile Ser Ser Ala Glu Asn Leu Lys Leu Met Met
 245 250 255
 Ile Leu Leu Arg Asp Lys Ser Lys Asn Ile Gln Phe Glu Ala Phe His
 260 265 270
 Val Phe Lys Leu Phe Val Ala Asn Pro Glu Lys Ser Glu Glu Val Ile
 275 280 285
 Glu Ile Leu Arg Arg Asn Lys Ser Lys Leu Ile Ser Tyr Leu Ser Ala
 290 295 300
 Phe His Thr Asp Arg Lys Asn Asp Glu Gln Phe Asn Asp Glu Arg Ala
 305 310 315 320
 Phe Val Ile Lys Gln Ile Glu Arg Leu
 325

<210> 95

<211> 399

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 95

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

ES 2 308 198 T3

Phe Ser Ile Cys Leu Gly Tyr Ser Lys Asp Asn Lys Phe val Thr val
 115 120 125
 Asp Tyr Leu Val Ser Gln Pro Lys Thr Ile Ser Leu Met Leu Arg Thr
 130 135 140
 Ala Glu val Ala Leu Gln Gln Lys Gly Cys Gln Asp Ile Phe Leu Thr
 145 150 155 160
 Val Gly Asn Met Ile Ile Glu Cys Ile Lys Tyr Glu Gln Leu Cys Arg
 165 170 175
 Ile Ile Leu Lys Asp Pro Gln Leu Trp Lys Phe Phe Glu Phe Ala Lys
 180 185 190
 Leu Gly Asn Phe Glu Ile Ser Thr Glu Ser Leu Gln Ile Leu Ser Ala
 195 200 205
 Ala Phe Thr Ala His Pro Lys Leu val Ser Lys Glu Phe Phe Ser Asn
 210 215 220
 Glu Ile Asn Ile Ile Arg Phe Ile Lys Cys Ile Asn Lys Leu Met Ala
 225 230 235 240
 His Gly Ser Tyr Val Thr Lys Arg Gln Ser Thr Lys Leu Leu Ala Ser
 245 250 255
 Leu Ile val Ile Arg Ser Asn Asn Ala Leu Met Asn Ile Tyr Ile Asn
 260 265 270
 Ser Pro Glu Asn Leu Lys Leu Ile Met Thr Leu Met Thr Asp Lys Ser
 275 280 285
 Lys Asn Leu Gln Leu Glu Ala Phe Asn val Phe Lys val Met val Ala
 290 295 300
 Asn Pro Arg Lys Ser Lys Pro val Phe Asp Ile Leu val Lys Asn Arg
 305 310 315 320
 Asp Lys Leu Leu Thr Tyr Phe Lys Thr Phe Gly Leu Asp Ser Gln Asp
 325 330 335
 Ser Thr Phe Leu Asp Glu Arg Glu Phe Ile val Gln Glu Ile Asp Ser
 340 345 350
 Leu Pro Arg Ile Ile Ser Ser Thr Thr Glu val Ser Asn Asn Asn Ala
 355 360 365
 Ser Ser Ser Asn val Ala Ser Ile Thr Ser Pro Ser Ser val Met Asn
 370 375 380
 Asn Gln Ser Ser Ile Leu Thr His Ser Thr Ser Pro Asp Ser Arg
 385 390 395

<210> 96

<211> 343

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 308 198 T3

<400> 96

Met Arg Gly Leu Phe Lys Ser Lys Pro Arg Thr Pro Ala Asp Ile Val
1 5 10 15

Arg Gln Thr Arg Asp Leu Leu Leu Tyr Ala Asp Arg Ser Asn Ser Phe
20 25 30

Pro Asp Leu Arg Glu Ser Lys Arg Glu Glu Lys Met Val Glu Leu Ser
35 40 45

Lys Ser Ile Arg Asp Leu Lys Leu Ile Leu Tyr Gly Asn Ser Glu Ala
50 55 60

Glu Pro Val Ala Glu Ala Cys Ala Gln Leu Thr Gln Glu Phe Phe Lys
65 70 75 80

Ala Asp Thr Leu Arg Arg Leu Leu Thr Ser Leu Pro Asn Leu Asn Leu
85 90 95

Glu Ala Arg Lys Asp Ala Thr Gln Val Val Ala Asn Leu Gln Arg Gln
100 105 110

Gln Val Asn Ser Arg Leu Ile Ala Ala Asp Tyr Leu Glu Ser Asn Ile
115 120 125

Asp Leu Met Asp Phe Leu Val Asp Gly Phe Glu Asn Thr Asp Met Ala
130 135 140

Leu His Tyr Gly Thr Met Phe Arg Glu Cys Ile Arg His Gln Ile Val
145 150 155 160

Ala Lys Tyr Val Leu Asp Ser Glu His Val Lys Lys Phe Phe Tyr Tyr
165 170 175

Ile Gln Leu Pro Asn Phe Asp Ile Ala Ala Asp Ala Ala Ala Thr Phe
180 185 190

Lys Glu Leu Leu Thr Arg His Lys Ser Thr Val Ala Glu Phe Leu Ile
195 200 205

Lys Asn Glu Asp Trp Phe Phe Ala Asp Tyr Asn Ser Lys Leu Leu Glu
210 215 220

Ser Thr Asn Tyr Ile Thr Arg Arg Gln Ala Ile Lys Leu Leu Gly Asp
225 230 235 240

Ile Leu Leu Asp Arg Ser Asn Ser Ala Val Met Thr Lys Tyr Val Ser
245 250 255

Ser Met Asp Asn Leu Arg Ile Leu Met Asn Leu Leu Arg Glu Ser Ser
260 265 270

Lys Thr Ile Gln Ile Glu Ala Phe His Val Phe Lys Leu Phe Val Ala
275 280 285

Asn Gln Asn Lys Pro Ser Asp Ile Ala Asn Ile Leu Val Ala Asn Arg
290 295 300

Asn Lys Leu Leu Arg Leu Leu Ala Asp Ile Lys Pro Asp Lys Glu Asp
305 310 315 320

Glu Arg Phe Asp Ala Asp Lys Ala Gln Val Val Arg Glu Ile Ala Asn
325 330 335

Leu Lys Leu Arg Glu Leu Ala
340

<210> 97

65 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 308 198 T3

<220>

<223> Péptido FLAG

5 <400> 97

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

10 <210> 98

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Fragmento bovino MBP

20 <400> 98

Gly His His Ala Ala Arg Thr Thr His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln
1 5 10 15

25 <210> 99

<211> 73

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

35 <400> 99

ggatccgccca ccatggagca gaagctgac tctgaagagg acttgccgtt cccgtttggg 60
aagcttcaca aat 73

<210> 100

<211> 34

45 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

50 <223> Cebador PCR

<400> 100

55 **ggatccttaa gcttctgct gagctggtct cttc 34**

<210> 101

<211> 78

60 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

65 <223> Cebador PCR

ES 2 308 198 T3

<400> 101

5 caccggatcc gccaccatgg agcagaagct gatctctgaa gaggacttgc ctttgtttag 60
taaatacacac aaaaatcc 78

<210> 102

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> Cebador PCR

<400> 102

20 ggatcctcaa ggggccgttt tcttcaagtc tcgg 34

<210> 103

<211> 69

<212> ADN

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

30 <223> Cebador PCR

<400> 103

[illegible]

<210> 104

40 $\langle 211 \rangle$ 35

<212> ADN

<213> Artificial

45 $\langle 220 \rangle$

<223> Cebador PCR

<400> 104

50 ggatcctcag aactcccaat cgtccacctc cagct 35

<210> 105

55 <211> 68

<212> ADN

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cebador PCR

<400> 105

65
ggatccgcca ccattgacta caaggacgac gatgacaagt ctctcttggg ttgctctctgc 60
acttcaag 68

ES 2 308 198 T3

<210> 106
<211> 36
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador PCR

10 <400> 106

ggatccctag aattcccagt atgagtcctt ttcata 36

15 <210> 107
<211> 66
<212> ADN
20 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador PCR

25 <400> 107

actagtgcga ccatggacta caaggacgac gatgacaaga agctcatcgg caagtacctg 60
atgggg 66

30 <210> 108
<211> 36
35 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
40 <223> Cebador PCR

<400> 108

actagttcag tcctccaggt agggcactac agtcat 36

45 <210> 109
<211> 14
50 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 109

55 Cys Asp Pro Met Lys Arg Ala Thr Ile Lys Asp Ile Arg Glu
1 5 10

60 <210> 110
<211> 22
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 308 198 T3

 $\langle 400 \rangle$ 110

Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys Gly
1 5 10 15

Ser Pro Asn Arg Arg Arg
 20

10 <210> 111
<211> 13
<212> PRT
<213> *Rattus rattus*

 $\langle 400 \rangle$ 111

20 Lys Phe Leu Arg Thr Ser Cys Gly Ser Pro Asn Tyr Ala
1 5 10

25

$\langle 210 \rangle$	112
$\langle 211 \rangle$	25
$\langle 212 \rangle$	ADN
$\langle 213 \rangle$	<i>Homo sapiens</i>

<400> 112

actgcagccc tggagcccag gaagc 25

35 <210> 113
<211> 30
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 113

ctagttagc ttgctgcaga tctccagcgc 30

50

$\langle 210 \rangle$	114
$\langle 211 \rangle$	69
$\langle 212 \rangle$	ADN
$\langle 213 \rangle$	<i>Homo sapiens</i>

<400> 114

actagtgcc ccatgtacc atacgatg g ccagattacg ccgaaggggc cgccgcgcct
gtggcgggg

60 <210> 115
<211> 30
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 115

ctagttgagc ttgctgcaga tctccagcgc 30

5

<210> 116

<211> 69

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 116

15 **actagtgcca ccatgtaccc atacgatgtg ccagattacg ccgagtcgct gggttttcgcg 60**
cggcgcctcc 69

20 <210> 117

<211> 33

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 117

30 ttaggtgagc ttgagcaga ccctcagtc ctg 33

<210> 118

<211> 55

35 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 118

40 gcgtcgacta cccatacgat gtgccagatt acgccgtcat ggcggatggc ccgag 55

<210> 119

45 <211> 55

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 119

gcactagtta cccatacgat gtgccagatt acgccgtcat ggcggatggc ccgag 55

55

<210> 120

<211> 36

<212> ADN

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 120

65 gagcgccgc taattcacca ggacataccc gttgtg 36

ES 2 308 198 T3

<210> 121
 <211> 60
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 121

 10 **gcggatccta cccatacgat gtgccagatt acgccgttat catgtcggag ttcagcgcg 60**

 <210> 122
 15 <211> 34
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 20 <400> 122

gagcgccgc tcactgcacc aggacaaacg tgcc 34

 25 <210> 123
 <211> 75
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*

 <400> 123

 35 **gcggatccta cccatacgat gtgccagatt acgccaaaga ttatgatgaa cttctcaaat 60**
attatgaatt acatg 75

 <210> 124
 40 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 45 <400> 124

gtgcggccgc ttataccttg cagctagata ggatgcttc c 41

 50 <210> 125
 <211> 69
 <212> ADN
 55 <213> *Homo sapiens*

 <400> 125

 60 **ccacccccac ccacccacgc acgcccaata tgtgggccc tatcggctgg agaagacgct 60**
gggcaaagg 69

 <210> 126
 65 <211> 31
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 126

cgatgcagcc tctcgcggtc cctgaagcag c 31

5

<210> 127

<211> 31

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 127

15 gctgcttcag ggaccgagaggctgcatc g 31

<210> 128

20 <211> 28

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 128

tcagggcaga ggggtcccg tgggtggcc 28

30 <210> 129

<211> 67

<212> ADN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 129

40 **gggtggggct ctcccgcta ccacctccc caccctcacc cctacctacc ccagcacgcc 60**
caatatg 67

<210> 130

45 <211> 76

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 130

ggatcctacc catacgatgt gccagattac gcctcgtccg gggccaagga gggaggtggg 60
ggctctcccg cctacc 76

55

<210> 131

<211> 25

60 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 131

65 gcggatccta cccatcacgat gtgcc 25

ES 2 308 198 T3

<210> 132

<211> 69

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 132

ggatccgcca ccattgtacc atacgatgtg ccagattacg ccacctgcac ggggaaggac 60
ggcggcgcg 69

<210> 133

<211> 57

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 133

gcggccgctc agaggctact ctcgtagctg gtggccacct tctggccctt aagccca 57

<210> 134

 $\langle 211 \rangle$ 90

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 134

35 ggagccgggc ccgcgggcgc cctgtgcct ccgccgcgc cggggtccc agccgcccc 60
 gctgccgtgt cccctgcgc cggccaggcg 90

<210> 135

<211> 41

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 135

50 tgaagagggt actgaaacca aaatctgcta ttttgatatt c 41

<210> 136

<211> 87

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 136

gattacgccg cggcggcggc ggcgagcggg gctggcgggg ctgccggggc cgggactggg 60
ggagccgggc ccgcgggccg cctgcctg 87

<210> 137

<211> 55

ES 2 308 198 T3

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 137

 gcggatccta cccatacgaat gtgccagatt acgccgcggc gccggcggcg agcgg 55

 10 <210> 138
 <211> 90
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*

 <400> 138

 20 aragcagatt ttggtttcag taacctcttc actcctgggc agctgctgaa gacctgggtg 60
 gccagccctc cctatgctgc acctgaactc 90

 25 <210> 139
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 139

 ctgtggacat aaaaaatggg atgcggaact ttcc 34
 35
 <210> 140
 <211> 34
 <212> ADN
 40 <213> *Homo sapiens*

 <400> 140

 45 ggaaagtcc gcatccatt tttatgtcc acag 34

 <210> 141
 50 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 141

 gagcgccgc ttacacgcct gctgtcca tgc 33

 60 <210> 142
 <211> 54
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 142

gcgaattcta cccatacga gtgccagatt acgcctcggc ccggacgcca ttgc 54

5

<210> 143

<211> 37

<212> ADN

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 143

15

catcatactt ctgatttatt aaggcatcat ttatttc 37

<210> 144

20

<211> 37

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 144

gaaataaaatg atgccttaaat aaatcagaag tatgatg 37

30

<210> 145

<211> 41

<212> ADN

35

<213> *Homo sapiens*

<400> 145

40

gagtcgactt acagcttaag ctcatctgct attttgatg c 41

<210> 146

<211> 54

45

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 146

50

gcggtaccta cccatacga gtgccagatt acgcctcggc ccggacgcca ttgc 54

55

<210> 147

<211> 43

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

60

<400> 147

gagcgccgc ttacagctta agctcatttg ctattttga tgc 43

65

ES 2 308 198 T3

<210> 148
 <211> 56
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 148
 10 **gcgtcgacta cccatacgat gtgccagatt acgccattcg gggccgcaac tcagcc 56**
 <210> 149
 <211> 56
 15 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 149
 20 **gcactagtta cccatacgat gtgccagatt acgccattcg gggccgcaac tcagcc 56**
 <210> 150
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 150
 35 **gagcgccgcg ttaaagcttc agctcgttgg ctatttgg 39**
 <210> 151
 <211> 73
 40 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 151
 45 **gcggccgcag ccaccatgta cccatacgat gtgccagatt acgcttccac taggacccca 60**
ttgccaacgg tga 73
 50 <210> 152
 <211> 41
 <212> ADN
 55 <213> *Homo sapiens*
 <400> 152
 60 **gcggccgctt acagctttag ctattggca atttgggaag c 41**
 <210> 153
 <211> 68
 65 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 308 198 T3

<400> 153

agatctgcc ccatgtacc atacgatgt ccagattacg cctcttcgcg gacggtgctg 60
gccccggg 68

<210> 154

<211> 25

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 154

15 **tgccctgaaa cagctccggg gcggc 25**

<210> 155

<211> 25

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25
<400> 155

gggatcgaag ctggacacgt tctgc 25

30

<210> 156

<211> 39

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 156

40 gcggccgctc acactccagg ggaatcggag cagccgggg 39

<210> 157

45 $\langle 211 \rangle$ 15

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

50 <223> Artificial AMPK sustrato cinasa

<400> 157

55 Ala Met Ala Arg Ala Ala Ser Ala Ala Ala Leu Ala Arg Arg Arg
1 5 10 15

<210> 158

60 $\langle 211 \rangle$ 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 308 198 T3

<400> 158

Leu Ser Asn Leu Tyr His Gln Gly Lys Phe Leu Gln Thr Phe Cys Gly
1 5 10 15
5
Ser Pro Leu Tyr Arg Arg Arg
20

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65