



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 882**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99916172 .2**

86 Fecha de presentación : **26.03.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1064389**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2001**

54 Título: **Composiciones de proteínas de fusión de quinasa Wee1, secuencias de nucleótidos, sistemas de expresión y procedimientos de uso.**

30 Prioridad: **27.03.1998 US 79752 P**

73 Titular/es: **THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**
10550 North Torrey Pines Road
Mail Drop TPC-8
La Jolla, California 92037, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

72 Inventor/es: **Russell, Paul;**
Boddy, Michael, N. y
Funari, Beth

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Composiciones de proteínas de fusión de quinasa WEE1, secuencias de nucleótidos, sistemas de expresión y procedimientos de uso.

Campo técnico

La invención se refiere a procedimientos y composiciones para seleccionar compuestos que inhiben o modulan la fosforilación de proteínas de fusión de Wee1 mediante quinasa Cds1.

Antecedentes

Los puntos de control del ciclo celular garantizan que el ADN cromosómico se replica y repara antes de la división nuclear (Hartwell *et al.*, Science, 246:629, 1989; L. Hartwell, Cell, 71:543, 1992; y S.J. Elledge, Science, 274:1664, 1996). En células de mamífero, la pérdida de control en los puntos de control da como resultado reorganizaciones, amplificación y pérdida de cromosomas, acontecimientos que se asocian de manera causal con el cáncer. En levaduras, son vitales los controles en los puntos de control para la supervivencia cuando el ADN está dañado o se inhibe la replicación.

Cdc2, la quinasa dependiente de ciclina que inicia la mitosis, es la diana final de los puntos de control de la reparación y la replicación del ADN y está regulada por quinasas de los puntos de control que se acoplan a la mitosis a la finalización de la replicación y reparación de ADN. La quinasa Chk1 del punto de control de la reparación regula Cdc25, una fosfatasa que activa Cdc2. En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, Cdc2 está inhibida por fosforilación en la tirosina-15. Esta fosforilación está catalizada por las quinasas Wee1 y Mik1 y revertida por la fosfatasa Cdc25. La fosforilación inhibidora de Cdc2 es crucial para los puntos de control de la replicación y la reparación en células de levadura de fisión y humanas (Enoch *et al.*, Cell, 60:665, 1990; Lundgren *et al.*, Cell, 64:1111, 1991; Jin *et al.*, J. Cell Biol., 134:963 (1996); Blasina *et al.*, Mol. Biol. Cell, 8:1013, 1997; y Rhind *et al.*, Genes Dev., 11:504, 1997). Chk1 aparentemente hace cumplir el punto de control de la reparación de ADN fosforilando e inhibiendo Cdc25 (Rhind *et al.*, Genes Dev., 11:504, 1997; Furnari *et al.*, Science, 277:1495, 1997; Sánchez *et al.*, Science, 277:1497 (1997); y Peng *et al.*, Science, 277:1501, 1997). Sólo se requiere Chk1 para el punto de control de la reparación, no para el punto de control de la replicación activado por hidroxurea (HU) (Walworth *et al.*, Nature, 363:368, 1993; y al-Khodairy *et al.*, Mol. Biol. Cell, 5:147, 1994).

Por tanto, la quinasa Wee1 participa en la regulación de puntos de control del ciclo celular durante la mitosis catalizando la fosforilación de la quinasa dependiente de ciclina que inicia la mitosis, Cdc2. No se ha caracterizado bien el papel de Wee1 en estos procesos reguladores para controlar el ciclo celular.

La quinasa Cds1 también se ha implicado en el proceso de los puntos de control, aunque no se comprende su papel (Marukami *et al.*, Nature, 374: 817, 1995).

Wu y Russell (Nature, 1993, 363: 738-741) describen un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos aislada, que codifica una proteína Wee1 recombinante que carece de los primeros 10 aminoácidos N-terminales.

Coleman *et al.* (Cell, 1993, 72:919-929) describen fragmentos de Wee1 truncada, que carecen del extremo amino o del carboxilo de la proteína.

Existe una necesidad de sistemas para caracterizar el papel de Wee1 y Cds1 en la regulación o ciclo celular, y para seleccionar compuestos que inhiben o modulan los efectores de estos procesos, particularmente inhibidores de la función de Wee1 o Cds1.

Breve resumen de la invención

Se ha descubierto ahora que Wee1 está fosforilado por Cds1, y que Cds1 tiene un importante papel en la regulación del punto de control de la replicación para la mitosis. También se ha descubierto que puede usarse Wee1 en diversas formas, incluyendo proteínas truncadas basadas en Wee1, en composiciones y procedimientos para evaluar los componentes de los procesos dependientes de Wee1 relacionados con el punto de control de la replicación, particularmente Cds1.

Por tanto, la invención se refiere, en un aspecto, a ácidos nucleicos que codifican una proteína Wee1 truncada, incluyendo vectores de expresión que contienen los ácidos nucleicos para la expresión de la proteína Wee1, según se define en las reivindicaciones 9-13.

La invención también se refiere a procedimientos, definidos en las reivindicaciones 1 y 14, para identificar compuestos que modulan la función de Wee1, o que modulan la capacidad de Cds1 para fosforilar Wee1.

Resultarán evidentes otros usos para el experto en la técnica a la luz de las presentes descripciones.

Descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1D ilustran la asociación de una quinasa regulada por HU con el extremo NH₂-terminal de Wee1 tal como se describe en el ejemplo 2.

La figura 1A es una fotografía de un análisis en gel de SDS-poliacrilamida de GST:Wee1¹⁵² y los productos de degradación producidos en bacterias y purificados con GSH-Sepharose. Los productos de degradación principales son GST fusionada a -70 aminoácidos de Wee1 (GST:Wee1⁷⁰) y GST no fusionada. Se tiñeron las proteínas con azul de Coomassie.

La figura 1B es una fotografía de un análisis de proteínas de células que se trataron con HU 12 mM durante un transcurso de tiempo de 1 hora a 30°C. Se incubaron los lisados celulares con proteínas GST:Wee unidas a GSH-Sepharose. Se lavó la GSH-Sepharose y se sometió a ensayo para determinar la actividad quinasa asociada. Se muestran las posiciones de GST:Wee1¹⁵² y GST:Wee1⁷⁰ tras electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12%.

La figura 1C es una fotografía de un análisis de proteínas que ilustra que la inactivación mutacional de *cdc22*, que codifica la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa, potencia la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰. Se hicieron crecer células que portaban el alelo *cdc22-M4S* sensible a la temperatura o células de tipo natural a 25°C. Se dividieron los cultivos y se mantuvieron a 25°C o se incubaron a 35,5°C durante 90 min. Se realizaron ensayos de fosforilación de GST:Wee1 tal como se describió anteriormente.

La figura 1D es un fotomontaje de gráfica y fotografía que ilustra la activación de la quinasa que fosforila GST:Wee1⁷⁰ en extractos de células *cdc25-22* liberadas en HU a partir de una detención en G2. Se cambió un cultivo de células *cdc25-22* que se hizo crecer a 25°C, a 35,5°C durante 4 h. se dividió el cultivo y se trató con HU 12 mM o se trató de manera simulada durante 45 min. a 35,5°C. Se devolvieron ambos cultivos a 25°C y se tomaron muestras cada 10 min. El índice de tabicación marca la finalización de la mitosis. Se sometieron a ensayo los lisados de cada punto de tiempo para determinar la GST:quinasa Wee1⁷⁰. La fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ se produjo en las muestras tratadas con HU tras la salida de M, mientras que la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ siguió siendo baja en las muestras del cultivo tratado de manera simulada. En el cultivo tratado de manera simulada, aumentó la actividad de la quinasa que fosforila GST:Wee1¹⁵² a medida que las células experimentaron la mitosis.

Las figuras 2A-2D ilustran que Cds1 es la quinasa que fosforila GST:Wee1⁷⁰ tal como se describe en el ejemplo 2.

La figura 2A es una fotografía de un análisis de proteínas que ilustra que la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ depende de Rad1 y Rad3. Se dividieron cultivos de cepas de tipo natural, *rad1* y *rad3* y se trataron durante 1 h con HU, o se trataron de manera simulada, y luego se sometieron a ensayo para determinar la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ tal como se describe en la figura 1.

La figura 2B es una fotografía de un análisis de proteínas que ilustra que la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ depende de Cds1 pero no de Chk1. Se dividieron cultivos de tipo natural, *chk1* y *cds1* y se trataron durante 1 h con HU, o se trataron de manera simulada. Se sometió a ensayo la fosforilación de GST:Wee1.

La figura 2C es una fotografía de un análisis de proteínas que ilustra que Cds1 interacciona con GST:Wee1 pero no con GST. Se incubaron lisados de las células tratadas con HU que expresan Cds1 marcado con epítipo (Cds1^{HAHIS}), expresado desde el locus genómico *cds1*, con GST o proteínas GST:Wee1 unidas a GSH-Sepharose. Tras lavado extenso, se resolvieron las muestras mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos contra HA y GST.

La figura 2D es una fotografía de un análisis de proteínas que ilustra que Wee1 interacciona con GST:Cds1 pero no con GST:Chk1 *in vivo*. Se hicieron crecer cepas que portan constructos de *nmt1:GST:chk1*⁺ o *nmt1:GST:cds1*⁺ integrados en medio mínimo (EMM2) sin tiamina a 30°C durante 16 h para inducir la expresión de proteínas de fusión con GST. Se lisaron las células y se purificaron las proteínas de fusión con GST con GSH-Sepharose. Tras lavado extenso, se resolvieron las muestras mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos contra Wee1, Cdc25 y GST. Se detectó una proteína de ~110 kDa correspondiente a Wee1 en la muestra de GST:Cds1, mientras que se detectó una proteína de ~80 kDa correspondiente a Cdc25 en la muestra de GST:Chk1. No se detectó la proteína de ~110 kDa en las muestras preparadas a partir de células $\Delta wee1$. GST:Cds1 y GST:Chk1 migran a posiciones correspondientes a ~82 y ~80 kDa, respectivamente.

Las figuras 3A-3D ilustran que HU estimula la actividad de la quinasa Cds1, la unión de Cds1 a GST:Wee1⁷⁰ en los lisados y la acumulación de Mik1 tal como se describe en el ejemplo 2. La figura 3A es una fotografía de un análisis de proteínas que ilustra que HU estimula la unión de Cds1 a GST:Wee1⁷⁰. Se dividió un cultivo de células que expresan Cds1^{HAHIS} desde el locus genómico *cds1* y se trató durante 3,5 h con HU o se trató de manera simulada. Se dividieron los cultivos de nuevo y se procesaron las muestras para la purificación con Ni²⁺-NTA de Cds1^{HAHIS} en condiciones desnaturizantes o la purificación de las proteínas que se unen a proteínas GST:Wee1 en condiciones no desnaturizantes. Tras lavado extenso, se resolvieron las muestras mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se sometieron a análisis de inmunotransferencia.

La figura 3B es una fotografía de un análisis de proteínas que ilustra que HU activa la actividad de la quinasa Cds1.

En un experimento separado, se purificó Cds1^{HAHIS} en condiciones nativas y se sometió a ensayo para determinar la actividad de autofosforilación (panel superior). El análisis de inmunotransferencia confirmó que se recuperaban cantidades similares de Cds1^{HAHIS} en las muestras tratadas con HU y de manera simulada (panel inferior).

La figura 3C es una fotografía de un análisis de proteínas que ilustra un aumento dependiente de Cds1 y Rad3 -en la abundancia de Mik1 en las células tratadas con HU. Se incubaron células de tipo natural, *cds1* y *rad3* en las que mik1 genómico codificaba la proteína Mik1^{HAHIS} durante 4 h en YES a 25°C con HU 12 mM o se trataron de manera simulada. Se purificó la proteína Mik1^{HAHIS} mediante purificación con Ni²⁺-NTA en condiciones desnaturalizantes y se detectó mediante inmunotransferencia con anticuerpos contra HA.

La figura 3D es una fotografía de cultivos celulares que ilustra que Mik1 es importante para la supervivencia al tratamiento con HU. Se cultivaron en placa diluciones en serie de células de tipo natural y *mik1* en medio YES complementado con HU 0 ó 6 mM y se incubaron durante 2 días a 30°C.

La figura 4 ilustra la detención del ciclo celular producida por la expresión de grandes cantidades de GST:Cds1 tal como se describe en el ejemplo 2. Se incubaron las células que tenían un constructo *nmt1::GST:cds1*⁺ integrado en medio de represión de *nmt1* (promotor “off” (“de inactivación”)) o medio de inducción (promotor “on” (“de activación”)) durante 19 h a 30°C. La expresión de GST:Cds1 indujo la detención del ciclo celular en cepas de tipo natural, *rad3* y *chk1*. El análisis de citometría de flujo confirmó que estas células se detuvieron con un contenido de ADN 2C. Las células que expresan Cdc2Y15F, una forma de Cdc2 en la que se sustituye la tirosina en la posición 15 por fenilalanina, no fueron sensibles a GST:Cds1.

Las figuras 5A-5B son gráficas que ilustran que se suprime el punto de control de la replicación en células *cds1 chk1* tal como se describe en el ejemplo 2. La figura 5A muestra que se obtuvieron cultivos sincrónicos mediante elutriación centrífuga. Se controló la progresión a través de la mitosis en presencia de HU 12 mM mediante la puntuación de células septadas o binucleadas. Las células de doble mutante *cds1 chk1* y *rad3* experimentaron mitosis en presencia de HU, mientras que se detuvo la división en cepas de control (de tipo natural, mutantes individuales *cds1* y *chk1*).

La figura 5B muestra que las células de doble mutante *cds1 chk1 yrad3* son igualmente hipersensibles a la inactivación mediante HU 12 mM. Las células de tipo natural y *chk1* no fueron sensibles a HU, mientras que las células *cds1* eran moderadamente sensibles.

Descripción detallada de la invención

La invención describe composiciones y sistemas para seleccionar compuestos que afectan al papel de Wee1 en puntos de control del ciclo celular. En particular, la invención describe una proteína truncada recombinante que contiene Wee1 que puede usarse en combinación con otros componentes del ciclo celular, particularmente Cds1, Chk1, Cdc2, Cdc25 y proteínas de puntos de control similares, en procedimientos para identificar y caracterizar rutas reguladoras y para identificar compuestos que modulan y/o inhiben componentes en las rutas, particularmente Cds1.

La invención describe proteínas de fusión GST:Wee1, que son útiles en los ensayos. La invención también describe una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una proteína de fusión que contiene quinasa Wee1 truncada. También se describen vectores de expresión para la expresión de una proteína de fusión de esta invención.

Además, la invención describe un ensayo para seleccionar moduladores de la regulación de puntos de control usando proteínas de fusión de Wee1. Un ensayo particular selecciona compuestos que modulan la actividad de la quinasa Wee1 o la quinasa Cds1.

A. Composiciones

En el presente documento, se describen proteínas Wee1 truncadas, ácidos nucleicos aislados que codifican proteínas Wee1, y vectores de expresión que contienen los ácidos nucleicos útiles para expresar una proteína Wee1 de esta invención. Las proteínas Wee1 son útiles para la evaluación de la función de la proteína Wee1, particularmente para identificar moduladores de la actividad de Wee1 o Cds1.

1. Proteína Wee1 truncada

En una realización, la invención se refiere al uso de una proteína Wee1 truncada para evaluar la función de Wee1 y para seleccionar moduladores de Wee1 o su molécula efectora, Cds1. Una proteína Wee1 truncada es un polipéptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos derivada de una proteína Wee1 nativa, y que comprende la región de Wee1 que es un sustrato funcional de Cds1. Preferiblemente, la proteína Wee1 truncada tiene una secuencia que corresponde sustancialmente a la secuencia de residuos de aminoácidos de Wee1 nativa, y más preferiblemente tiene la misma secuencia de residuos de aminoácidos que se encuentra en la proteína Wee1 nativa.

Por “corresponde sustancialmente a” significa que puede haber sustituciones y/o deleciones en la secuencia de residuos de aminoácidos de Wee1 nativa siempre que se no se vea afectada sustancialmente la actividad biológica de la proteína Wee1 como sustrato funcional de Cds1. Es decir, la proteína Wee1 truncada con una secuencia modificada actúa en los ensayos tal como se describe en los ejemplos para los fines de medir la actividad de Wee1.

Se entiende que la longitud de una proteína Wee1 puede variar siempre que esté presente la región para actuar como un sustrato funcional de la fosforilación de Cds1, tal como se describe en el presente documento. Una proteína Wee1 truncada preferida comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácidos 11-70 de Wee1 nativa, preferiblemente los residuos 11-72 ó 10-70 ó 10-72. Se prefiere particularmente una proteína que comprende los residuos 11-72. En una realización relacionada, una proteína Wee1 truncada comprende los residuos 11-152 o los residuos 10-152. También pueden describirse y construirse fácilmente otras combinaciones mediante los procedimientos descritos en el presente documento, y por tanto, no debe considerarse que la invención está limitada de este modo.

Wee1 es una proteína grande y la secuencia completa de residuos de aminoácidos y la correspondiente secuencia de nucleótidos de ADNc se conocen bien y están disponibles en la base de datos Genbank con el número de acceso M16508.

Mediante el término “truncada” se quiere decir que la proteína Wee1 no es la proteína Wee1 de tipo natural, de longitud completa; en su lugar una proteína truncada contiene delecciones de residuos de aminoácidos en el extremo amino-terminal, y opcionalmente también en el extremo carboxi-terminal de la secuencia de tipo natural tal como se describe en el presente documento. Las delecciones particularmente preferidas incluyen proteínas en las que se han delecionado los residuos 1-9, los residuos 1-10, los residuos 73-152 o los residuos 71-152.

Se describen proteínas Wee1 truncadas particularmente preferidas en los ejemplos, y tienen una secuencia de residuos de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 1 para el constructo proteico GST:Wee1(11-72) y la mostrada en SEC ID NO 3 para el constructo proteico GST:Wee1(11-152).

Se proporciona una proteína Wee1 truncada objeto en la forma de una proteína de fusión. Es decir, una proteína que comprende una proteína Wee1 truncada de la presente invención operativamente unida a glutatión-S-transferasa (GST) en la que la unión operativa está en forma de un enlace peptídico que se encuentra normalmente entre los aminoácidos de un polipéptido. Las proteínas de fusión se conocen bien en la técnica y se usan por las ventajas proporcionadas por la presencia de una segunda función proteica proporcionada por esa segunda proteína. Estas funciones pueden incluir etiquetas para facilitar el aislamiento o la identificación de la proteína de fusión, para producir una proteína bifuncional, y funciones similares.

Se describen a modo de ejemplo proteínas de fusión, nucleótidos, vectores de expresión y procedimientos para preparar las proteínas de fusión, nucleótidos y vectores en los ejemplos.

2. Ácidos nucleicos y Vectores de expresión

En otra realización, la invención contempla una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína Wee1 truncada de esta invención, y vectores de expresión que pueden expresar la proteína desde el ácido nucleico.

El ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión GST:Wee1 tal como se muestra en SEC ID NO 1 ó 3.

También se contemplan vectores de expresión para la expresión de una proteína Wee1 truncada de la presente invención. Un vector de expresión comprende un ácido nucleico de la presente invención operativamente unido a los elementos de ácido nucleico recombinantes necesarios para la transcripción y la traducción del ácido nucleico para expresar la Wee1 codificada. Tales elementos de control de la expresión, de la transcripción y de la traducción se conocen bien en la técnica y la técnica no debe considerarse como limitante. Estos elementos de control de la expresión pueden incluir además potenciadores de la transcripción, promotores de la transcripción, iniciadores y terminadores de la traducción, y elementos similares.

Se describen vectores de expresión preferidos en los ejemplos, o están disponibles comercialmente a partir de una variedad de fuentes. Se prefieren particularmente los vectores de expresión pGEX disponibles comercialmente. Se muestra la secuencia de nucleótidos completa de dos vectores preferidos en SEC ID NO 2 y 4, y corresponden a pGEX-GST:Wee1(11-72) y pGEX-GST:Wee1(11-152), respectivamente.

B. Procedimientos para identificar moduladores de Wee1

La invención también contempla una variedad de procedimientos para evaluar la función de Wee1, y particularmente para identificar moduladores de Wee1 o moduladores de Cds1, que fosforila Wee1. Tal como se muestra mediante los ejemplos, el análisis de los diversos componentes de la regulación del ciclo celular, particularmente el punto de control de la replicación, puede llevarse a cabo en una variedad de formatos, incluyendo mediante el uso de proteínas aisladas, lisado celular que contiene uno o más de los componentes, cepas genéticas de las células para proporcionar diferentes componentes del punto de control, todos en combinaciones con la proteína Wee1 truncada de esta invención.

Un procedimiento preferido implica la evaluación de la interacción entre Cds1 y Wee1, en el que se observa que Wee1 es un sustrato de fosforilación para Cds1. El sitio en Wee1 para la fosforilación está en la parte amino-terminal de la proteína Wee1 designada como el sustrato funcional para la fosforilación de Cds1 tal como se describe en el presente documento.

Por tanto, en una realización, la invención describe un procedimiento para identificar un compuesto que modula la actividad de la quinasa Cds1 que comprende las etapas de:

a) combinar:

i) un compuesto de prueba;

ii) una proteína Wee1 truncada tal como se describió anteriormente; y

iii) una composición que comprende una proteína Cds1;

b) mantener la combinación de la etapa (a) en condiciones suficientes para que Cds1 fosforile dicha proteína Wee1 truncada; y

c) determinar la cantidad de proteína Wee1 fosforilada, mediante lo cual la cantidad de Wee1 fosforilada indica si dicho compuesto de prueba modula la actividad de Cds1.

En este procedimiento, el compuesto de prueba puede ser cualquier sustancia que se cree que tiene un efecto sobre la capacidad de Cds1 para fosforilar Wee1, tal como una molécula o sustancia de prueba que se cree que es un candidato a fármaco para modular los puntos de control del ciclo celular inhibiendo la interacción de fosforilación entre Cds1 y Wee1.

La mezcla de reacción de prueba contiene además una proteína Wee1 truncada según la presente invención, y puede proporcionarse en una variedad de formas, tal como se describe en el presente documento. La mezcla contiene además una composición que comprende una proteína Cds1 que puede fosforilar una proteína Wee1 truncada de esta invención en una cantidad suficiente para producir fosforilación detectable en las condiciones de reacción.

La fuente de la proteína Cds1 en una composición que contiene una proteína Cds1 puede variar ampliamente, y por tanto, no debe considerarse que la invención está limitada de este modo. Por ejemplo, la proteína puede estar en forma de una proteína aislada proporcionada *in vitro* a una mezcla de reacción. La proteína Cds1 puede aislarse mediante una variedad de procedimientos conocidos que incluyen la extracción bioquímica o la inmunoadsorción a partir de lisados celulares, la expresión de proteínas recombinantes usando ADNc de Cds1 clonado, y procedimientos similares conocidos en las técnicas de quinasas de puntos de control.

También puede proporcionarse una proteína Cds1 preparando un lisado de una célula que contiene una proteína Cds1, tal como se describe en el presente documento. Se dispone de muchas cepas genéticas diferentes de células, tales como cepas de levaduras (por ejemplo, *S. pombe*), que expresan proteínas Cds1 de tipo natural (wt, "wild type") o genéticamente variantes adecuadas para su uso en los procedimientos de la presente invención, cepas y preparación y manejo de lisados celulares que se describen con más detalle en los ejemplos. Además, tal como se muestra en el presente documento, Cds1 se une a Wee1, y por tanto, puede aislarse mediante el uso del aislamiento con perlas de Sepharose de la proteína GST:Wee1 tras su mezcla con lisados celulares que contienen Cds1, tal como se describe en los ejemplos.

Se conocen generalmente bien en la técnica las condiciones para mantener la mezcla combinada, para permitir la fosforilación catalizada por Cds1 de Wee1, pueden variar ampliamente dependiendo del formato de reacción y, por tanto, no han de considerarse limitantes. Se describen ejemplos de las condiciones de reacción en los ejemplos y en la técnica, e incluyen una variedad de componentes de reacción para mantener la bioquímica de la fosforilación de Wee1 por Cds1, incluyendo tampones, donadores de fosfato y similares.

También pueden variar ampliamente los procedimientos para determinar las cantidades de la reacción de fosforilación, y dependen en parte de la naturaleza de la química de la reacción. Normalmente, el donador de fosfato tiene un grupo saliente de fosfato marcado, tal como gamma-³²P, y un sustrato marcado similar. La detección también puede implicar aislar la proteína Wee1 y medir la cantidad de marcador presente en la proteína Wee1, tal como se describe en los ejemplos usando electroforesis en gel de SDS y autografía para medir la cantidad de radiactividad asociada con la proteína Wee1.

Pueden determinarse las cantidades relativas de fosforilación usando comparaciones con reacciones control con cantidades de la proteína Cds1, la proteína Wee1 y condiciones de la reacción control conocidas, tal como se conoce bien.

En una realización relacionada, la invención contempla un procedimiento para identificar un compuesto que modula la actividad de la quinasa Wee1 que comprende las etapas de:

a) combinar:

i) un compuesto de prueba;

ii) una proteína Wee1 truncada de SEC ID NO:1 ó 3; y

iii) un reactivo para Wee1;

b) mantener la combinación de la etapa (a) en condiciones adecuadas para que Wee1 reaccione con dicho reactivo;

y

c) determinar la cantidad en que reacciona Wee1 con dicho reactivo, mediante lo cual la cantidad de reacción indica si dicho compuesto de prueba modula la actividad de Wee1.

Muchos aspectos del procedimiento anterior son similares a los del procedimiento descrito anteriormente en el presente documento para identificar moduladores de la fosforilación por Cds1 de Wee1, y por tanto, no se tratarán de nuevo.

En el procedimiento, un reactivo para Wee1 se refiere a cualquier compuesto o proteína que interacciona con Wee1 en una reacción detectable, y puede incluir un cofactor para la reacción, un sustrato para la quinasa Wee1, o una enzima que utiliza por sí misma Wee1 como sustrato, cualquiera de los cuales se modifica en la reacción de tal manera que puede medirse la cantidad de reacción.

Por tanto y por ejemplo, el reactivo puede ser un sustrato donador de fosfato que reacciona en la mezcla de reacción, tal como un sustrato de quinasa Cds1 que dona un fosfato marcado a Wee1 en presencia de Cds1 (por ejemplo, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$). En este caso, la determinación comprende medir la fosforilación de la proteína Wee1. Como alternativa, el reactivo puede ser un sustrato de Wee1 tal como Cdc22 que se fosforila por Wee1 tal como se describe en el presente documento, y la determinación comprende medir la fosforilación de Cdc22 de manera similar a los procedimientos descritos en el presente documento.

En los ejemplos, se describen otros formatos de procedimiento a modo de ejemplo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran, pero no limitan, la presente invención.

1. Preparación de proteínas de fusión GST:Wee1

Para estudiar el papel de Wee1 sobre Chk1, se diseñó un sistema modelo usando proteínas de fusión basadas en Wee1. Se desarrolló la justificación porque se sabía que sólo se requiere Chk1 para el punto de control de la reparación, no para el punto de control de la replicación activado por hidroximetilurea (HU) (Walworth *et al*, Nature, 363:368, 1993; y al-Khodairy *et al*, Mol. Biol. Cell, 5:147, 1994). Sin embargo, se suprime rápidamente una detención del ciclo celular inducida por HU tras la inactivación de la proteína Wee1 sensible a la temperatura en un fondo de mik1, mostrando que el punto de control de la replicación requiere la fosforilación inhibidora de Cdc2. Wee1 y Mik1 no se requieren individualmente para una detención por HU, lo que indica que Wee1 y Mik1 pueden estar reguladas de manera coordinada por el punto de control de la replicación. Para probar esta hipótesis, se preparó un constructo para evaluar si Wee1 se fosforilaba por una quinasa activada por HU, centrándose la atención en el dominio regulador NH_2 -terminal (Aligue *et al*, J. Biol. Chem., 272:13320, 1997).

Para este fin, se diseñó y construyó una fusión de proteína glutatión-S-transferasa (GST) con los aminoácidos 10-152 de Wee1, y se designa como GST:Wee1¹⁵² (también denominada en el presente documento como GST:Wee1(11-152)).

En primer lugar, se preparó un fragmento de PCR que codifica los aminoácidos 10 a 152 de Wee1 usando la secuencia de nucleótidos y la secuencia de residuos de aminoácidos conocidas de la proteína Wee1 nativa, incorporando un sitio NdeI en 5' y un sitio NotI/codón de terminación en 3' en el fragmento. Se clonó entonces este fragmento en un vector pGEX modificado y se transformó en el huésped de expresión *E. coli* BL21 (DE3) [Shiozaki *et al*, Meth. Enz., 283:506 (1997)]. El constructo de vector de expresión se denomina en el presente documento como pGEX-GST:Wee1 (11-152), y tiene una secuencia de nucleótidos completa mostrada en SEC ID NO 4.

De manera similar, se diseñó y construyó una fusión de proteína de GST con los aminoácidos 11-72 de Wee1, y se designa como GST:Wee1⁷⁰ (también denominada en el presente documento como GST:Wee1(11-72)). El constructo de vector de expresión se denomina en el presente documento como pGEX-GST:Wee1(11-72), y tiene una secuencia de nucleótidos completa mostrada en SEC ID NO 2.

Se indujo la expresión de una proteína de fusión GST:Wee1 por el vector de expresión pGEX en el huésped BL21 mediante la adición de IPTG (1 mM) a células con crecimiento exponencial a $\text{DO}_{600} = 0,6$ en medio LB más ampicilina 50 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C. Tras 2 horas a 37°C, se recogieron las células por centrifugación y se almacenaron a -70°C

en alícuotas (volumen de sedimento de 200 μ l). Se lisaron las células en 600 μ l de tampón de lisis [Tris 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 0,1%, leupeptina/aprotinina/pepstatina 5 μ g/ml, PMSF 1 mM] mediante sonicación, se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 min. a 4°C. Se añadió GSH-Sepharose (volumen de perla de 50 μ l) al sobrenadante y se incubó a 4°C durante 30 min. Entonces se lavaron las perlas 3 veces con 1 ml de tampón de lisis para producir proteína de fusión GST:Wee1 recombinante aislada, expresada.

Las preparaciones de proteína produjeron GST:Wee1⁷⁰ y GST:Wee1¹⁵² de longitud completa (figura 1A), siendo éste último un producto de truncamiento que contiene -70 aminoácidos de la parte amino-terminal de la proteína Wee1.

2. Evaluación de la función de Wee1 en el ciclo celular

Se usaron las proteínas GST:Wee1¹⁵² y GST:Wee1⁷⁰ preparadas en el ejemplo 1 para estudiar funciones celulares de levaduras. Para este fin, se unieron las proteínas aisladas a glutatión (GSH)-Sepharose y se mezclaron con lisados celulares de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) recogidos a intervalos durante la incubación con hidroxurea (HU).

Se obtuvieron los lisados celulares a partir de una variedad de cepas de células de *S. pombe* que tienen los siguientes genotipos: PR109, de tipo natural; NB2117, *cds1::ura4+*; NB2118, *cds1:2HA6His:ura4+*; NR1826, *rad3::ura4+*; OM591, *cdc22-M45*; NR1593, *rad1::ura4+*; NR1592, *chk1::ura4+*; BF1758, *nmt1:GST:chk1:leu1+*; BF1916, *nmt1:GST:cds1:leu1+*; OM2173, *mik1:2HA6His:ura4+*; OM2183, *mik1:2HA6His:ura4+ cds1::ura4+*; PR712, *mik1::ura4+*; y BF2115, *cds1::ura4+ chk1::ura4+*. Todas las cepas fueron *leu1-32 ura4-D18*. Se integraron todos los constructos de promotor *nmt1* en el locus *leu1-32*. Se han descrito medios de crecimiento y procedimientos generales para *S. pombe* [Moreno *et al*, Meth. Enzymol., 194:795 (1991)]. A menos que se indique lo contrario, se hicieron crecer cultivos de levaduras en medio YES a 30°C. YES está constituido por glucosa, extracto de levaduras y complementos de aminoácidos. Se usó hidroxurea a una concentración de 12 mM. Se realizó la purificación de proteínas de fusión con GST y proteínas marcadas con etiqueta de hexahis expresadas en *S. pombe*, inmunotransferencia y ensayos de quinasa tal como se describe [Shiozaki *et al*, Nature, 378:739 (1995)].

Se lavaron las proteínas unidas a GSH-Sepharose, se incubaron con [γ -³²P]ATP y se analizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (figura 1B). Se fosforiló GST:Wee1¹⁵² en la muestra de 0 min., mientras que la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ era insignificante. La fosforilación de ambas proteínas aumentó durante la incubación en HU. No se fosforiló la GST no fusionada. Por tanto, GST:Wee1⁷⁰ se asocia con y se fosforila por una quinasa regulada por HU, mientras que GST:Wee1¹⁵² se fosforila por esta quinasa y otra que es activa antes del tratamiento con HU.

La hidroxurea evita la de replicación de ADN inhibiendo la ribonucleótido reductasa y reduciendo así las reservas de desoxirribonucleótido, pero HU puede tener también otros efectos. Sin embargo, la inactivación mutacional de *cdc22*, que codifica la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa (Fernández-Sarabia *et al*, Mol. Gen. Genet., 238:241, 1993), provocó la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ en lisados celulares (figura 1C), indicando que el efecto de HU se debe a la inhibición de la replicación de ADN.

Se sometió a ensayo la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ en lisados de células *cdc25-22* sensibles a la temperatura que se detuvieron en G2, se incubaron en HU durante 45 min., y luego se liberaron de la detención en G2 en medio que contenía HU. La hidroxurea no pudo inducir la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ en lisados preparados a partir de células *cdc25-22* detenidas en G2 (figura 1D). Con la liberación de G2, aumentaron la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ y la septación celular de manera coincidente. La septación marca el final de la mitosis (M) y el comienzo de la replicación de ADN (S), por tanto, aumentó la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ a medida que las células se encontraron con la detención por HU. No se detectó un aumento en la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ en un cultivo tratado con HU simulado (figura 1D). Estas observaciones indican que la quinasa que fosforila GST:Wee1⁷⁰ se activa cuando las células intentan producir la replicación de ADN con desoxirribonucleótidos insuficientes.

Se suprimió la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ en lisados preparados a partir de los mutantes de los puntos de control *rad1* y *rad3* (figura 2A), lo que sugiere que la quinasa que fosforila GST:Wee1⁷⁰ puede participar en el punto de control de la replicación. Se llevaron a cabo experimentos para identificar esta quinasa. Se excluyó Chk1 mediante experimentos que usaban lisados preparados a partir de células *chk1* (figura 2B). Se indicó la participación de Cds1, una proteína quinasa que es importante para la supervivencia del tratamiento con HU (Murakami *et al*, Nature, 374:817, 1995), por la observación de que se suprimió la fosforilación de GST:Wee1⁷⁰ en un lisado preparado a partir de células *cds1* tratadas con HU (figura 2B). Se realizó un experimento para determinar si Cds1 coprecipitaba con GST:Wee1⁷⁰. Se incubaron lisados de células tratadas con HU en las que *cds1* genómico codifica una proteína con una etiqueta HAHIS COOH-terminal (constituida por dos epítosos HA seguidos por hexahistidina) con proteínas GST:Wee1 o GST, se lavaron y analizaron mediante inmunotransferencia. Cds1^{HAHIS} precipitó con GST:Wee1 pero no con GST no fusionado (figura 2C). Rad3 no se asoció con GST:Wee1. Cds1 purificado a partir de levaduras de fisión fosforiló GST:Wee1⁷⁰ *in vitro*, produciendo un mapa bidimensional de fosfopéptidos tripticos que era idéntico al mapa obtenido a partir de GST:Wee1⁷⁰ fosforilada por su quinasa asociada. Estos datos indican que Cds1 es la quinasa regulada por HU que se asocia con y fosforila GST:Wee1⁷⁰.

También se examinó *in vivo* la asociación de Cds1 y Wee1. se expresó GST:Cds1 a partir del promotor *nmt1* reprimible por tiamina.

Para marcar con etiqueta *cds1+* genómico con una secuencia que codifica dos copias del epítipo HA y hexahistidina, se preparó por PCR un fragmento de PstI-NotI que tenía los nucleótidos 205-1465 del marco de lectura abierto de *cds1+*. Éste se introdujo en pRIP42-Spc1HA6H tras digestión con las enzimas PstI y NotI [Shiozaki *et al*, Meth. Enz., 283:506 (1997)]. Se linealizó el constructo con NheI y se transformó en PR109. Se confirmó la integración y el marcado con etiqueta mediante hibridación de ADN de tipo Southern ADN e inmunotransferencia, confirmando la función de Cds1^{HAHIS} por la carencia de sensibilidad a HU. Se preparó el constructo *nmt1:GST:cds1+* tal como se describe para el constructo *nmt1:GST:chk1+* (Furnari *et al*, Science, 277:1495, 1997).

Como control, se utilizó una cepa que expresó GST:Chk1. Se purificaron con GSH-Sepharose las proteínas de fusión con GST y se analizaron mediante inmunotransferencia. Cdc25 (pero no Wee1) se asoció con GST:Chk1, mientras que Wee1 (pero no Cdc25) se asoció con GST:Cds1 (figura 2D).

HU puede aumentar la abundancia de Cds1, o hacer Cds1 competente para asociarse con Wee1, o quizá el punto de control de la replicación potencia la actividad quinasa de Cds1. Se trataron células que expresan Cds1^{HAHIS} con HU o se trataron de manera simulada, se prepararon lisados y se precipitaron con proteínas GST:Wee. Se detectó la asociación de Cds1^{HAHIS} con GST:Wee1 en lisados de células tratadas con HU, mientras que Cds1^{HAHIS} no se asoció con GST:Wee1 en muestras tratadas de manera simulada (figura 3A). La precipitación con Ni²⁺-NTA de Cds1^{HAHIS} a través de la secuencia de hexahistidina mostró que Cds1^{HAHIS} era igualmente abundante en los lisados de células tratadas con HU o tratadas de manera simulada. Por lo tanto, el tratamiento con HU potenció la asociación de Cds1 con GST:Wee1. La interacción *in vivo* entre GST:Cds1 y Wee1 mostrada en la figura 2D no requirió tratamiento con HU, presumiblemente porque se sobreexpresó GST:Cds1.

También se purificó Cds1^{HAHIS} a partir de células tratadas con HU o de manera simulada y se sometió a ensayo en un ensayo de autofosforilación. Aumentó la fosforilación de Cds1 en las muestras de células tratadas con HU (figura 3B). Se obtuvieron resultados similares usando GST:Wee1⁷⁰ como sustrato. Por tanto, HU aparentemente activa Cds1 como quinasa y estimula la unión a Wee1.

La fosforilación de Wee1 por Cds1 puede desempeñar un papel en el punto de control de la replicación de ADN. Sin embargo los mutantes *wee1* detuvieron la división en respuesta a HU (Enoch *et al*, Cell, 60:665, 1990), por tanto, también debe regularse otra proteína que controla la fosforilación de Tyr¹⁵ de Cdc2 por el punto de control de la replicación. La quinasa Mik1 fosforila Cdc2 en Tyr¹⁵ (Lundgren *et al*, Cell, 64:1111, 1991), por tanto, se controló la abundancia de Mik1 en células tratadas con HU usando una cepa que expresa Mik1^{HAHIS} desde el locus genómico. El análisis de inmunotransferencia mostró que aumentó la cantidad de Mik1^{HAHIS} en las células tratadas con HU (figura 3C). La abundancia de ARNm de *mik1* permaneció inalterada en células tratadas con HU, por tanto, HU debe influir en la síntesis o recambio de Mik1. Se suprimió enormemente el aumento inducido por HU de Mik1^{HAHIS} en células *cds1* y *rad3* (figura 3C), lo que indica que esta respuesta estaba regulada por el punto de control de la replicación. Mik1 es un inhibidor de la mitosis dependiente de la dosis (Lundgren *et al*, Cell, 64:1111, 1991), por tanto, el aumento de la abundancia de Mik1 en células tratadas con HU debe ayudar a reforzar el punto de control. De hecho, los mutantes de *mik1* mostraron una sensibilidad a HU potenciada (figura 3D).

La expresión de una gran cantidad de GST:Cds1 a partir del promotor *nmt1* produjo una detención del ciclo celular, tal como se indica mediante células sumamente alargadas (figura 4). La detención se produjo en mutantes de *rad3* y *chk1*, lo que indica que Cds1 funciona aguas abajo de Rad3 e independientemente de Chk1. La expresión de GST:Cds1 no tuvo efecto en las células que expresan Cdc2Y15F, una forma de Cdc2 que no puede fosforilarse por Wee1 o Mik1. Estos hallazgos respaldan la conclusión de que Cds1 transmite una señal de punto de control.

Las células que carecen de Cds1 detienen la división en respuesta a HU, lo que indica que la señal de Cds1 se complementa mediante otras proteínas de los puntos de control (Murakami *et al*, Nature, 374:817, 1995). Se examinó el punto de control de la replicación en cultivos sincrónicos de células de doble mutante *cds1 chk1*, mutantes individuales *cds1*, *chk1*, *rad3* o células de tipo natural.

En primer lugar se hicieron crecer las células en medio YES (extracto de levaduras y glucosa) hasta una DO600 de 1,0 y luego se trataron con HU (12 mM) durante 90 min. a 30°C. Se obtuvieron entonces células sincrónicas mediante elutriación centrífuga con un rotor de elutriación Beckman JE-5.0. Se diluyeron estas células hasta una DO600 de 0,3 en YES que contenía HU 12 mM y se hicieron crecer a 30°C durante otras 4 h. Se puntuaron las células según la progresión a través de la mitosis mediante observación al microscopio. Se llevaron a cabo estudios de sensibilidad a HU con células que se hicieron crecer hasta una DO600 de 0,3 en medio YES y luego se diluyeron hasta 13.000 células/ml en medio YES que contenía HU (12 mM), seguido por crecimiento a 30°C durante otras 8 h. Se tomaron muestras (75 µl) a intervalos regulares, se sembraron en placas de YES y se hicieron crecer durante 4 días a 30°C para determinar la supervivencia.

HU detuvo la división en las células de tipo natural, mutantes individuales *cds1* y *chk1* (figura 5A). Por el contrario, las células de doble mutante *cds1 chk1* experimentaron división con una cinética que era similar a la de las células *rad3*. Por tanto, se suprimió el punto de control en las células *cds1 chk1*. De hecho, las células de doble mutante *cds1 chk1* eran extremadamente sensibles a la inactivación por HU (figura 5B). Estos hallazgos concuerdan con un estudio reciente (Lindsay *et al*, Genes Dev., 12:382, 1998) y respaldan un modelo en el que Cds1 tiene un papel directo en reforzar el punto de control de la replicación.

ES 2 286 882 T3

Estos hallazgos indican que Cds1 y Chk1 son efectores duales del punto de control de la replicación. Chk1 regula Cdc25, mientras que parece que Cds1 fosforila Wee1 y se requiere para aumentar la abundancia de Mik1. Se desconoce el efecto de la fosforilación de Wee1 por Cds1 y sigue estando por confirmar con estudios *in vivo*, pero es sorprendente que el punto de control de la replicación aumente tanto la actividad quinasa de Cds1 como estimule la unión a Wee1 en extractos celulares. El gran aumento inducido por HU en la abundancia de Mik1 ayuda a explicar por qué las células de doble mutante *cdc25 wee1* detienen la división en respuesta a HU y reafirma la importancia de la fosforilación de Tyr¹⁵ de Cdc2 en el punto de control de la replicación (Enoch *et al*, Genes Dev., 6:2035, 1993). Cds1 comparte una identidad de secuencia significativa con la quinasa Rad53p, una proteína que participa en el punto de control de la replicación de ADN en *Saccharomyces cerevisiae* (S.J. Elledge, Science, 279:1664, 1996).

Previamente se desconocían los efectores del punto de control de la replicación activados por hidroximetilurea (HU). El tratamiento de levaduras de fisión con HU estimuló la quinasa Cds1 que fosforila la quinasa Wee1, un inhibidor de Cdc2. También se requirió la proteína quinasa Cds1 para un gran aumento inducido por HU en la cantidad de Mik1, un segundo inhibidor de Cdc2. Se suprimió la detención inducida por HU de la división celular en células *cds1 chk1*. Por tanto, Cds1 y Chk1 refuerzan conjuntamente el punto de control de la replicación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar un compuesto que modula la actividad de la quinasa Cds1 que comprende las etapas de:

a) combinar:

i) un compuesto de prueba;

ii) una proteína Wee1 truncada que comprende una región que es funcional como un sustrato de fosforilación de Cds1 y que carece de los residuos de aminoácidos 1-9 de la proteína Wee1 nativa (número de acceso Genbank M16508) y, estando la proteína Wee1 truncada operativamente unida a glutatión-S-transferasa (GST); y

iii) una composición que comprende una proteína Cds1;

b) mantener la combinación de la etapa (a) en condiciones suficientes para que Cds1 fosforile dicha proteína Wee1;

c) determinar la cantidad de proteína Wee1 fosforilada, mediante lo cual la cantidad de Wee1 fosforilada indica si dicho compuesto de prueba modula la actividad de Cds1.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína Wee1 truncada carece de los residuos de aminoácidos 1-10 de la proteína Wee1 nativa (número de acceso Genbank M16508).

3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína Wee1 truncada comprende los residuos de aminoácidos 10-152 de la proteína Wee1 nativa (número de acceso Genbank M16508).

4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína Wee1 es una proteína de fusión glutatión-S-transferasa (GST):Wee1 que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 1 o SEC ID NO 3.

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho compuesto de prueba es una proteína seleccionada del grupo constituido por Cdc22, Cdc25, Chk1, Mik1 y variantes genéticas de las mismas.

6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las condiciones comprenden un sustrato de quinasa Cds1 marcada con fosfato.

7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición que comprende una proteína Cds1 es un lisado celular.

8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha composición que comprende una proteína Cds1 comprende una proteína Cds1 aislada.

9. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína Wee1 truncada constituida por los residuos de aminoácidos 10-152 de la proteína Wee1 nativa (número de acceso Genbank M16508) operativamente unidos a glutatión-S-transferasa (GST).

10. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína de fusión glutatión-S-transferasa (GST):Wee1 que está constituida por una secuencia de residuos de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 1 o SEC ID NO 3.

11. El polinucleótido según la reivindicación 10, estando dicho polinucleótido constituido por la secuencia mostrada en SEC ID NO 2 o SEC ID NO 4.

12. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 10, pudiendo dicho vector expresar dicha proteína de fusión glutatión-S-transferasa (GST):Wee1 codificada por dicho polinucleótido.

13. El vector de expresión según la reivindicación 12, en el que dicho polinucleótido está constituido por la secuencia mostrada en SEC ID NO 2 o SEC ID NO 4.

14. Un procedimiento para identificar un compuesto que modula la actividad de la quinasa Wee1, que comprende las etapas de:

a) combinar:

i) un compuesto de prueba;

ES 2 286 882 T3

ii) una proteína de fusión glutatión-S-transferasa (GST):Wee1 que está constituida por una secuencia de residuos de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 1 o SEC ID NO 3; y

iii) un reactivo para Wee1 que es un compuesto o proteína que interacciona con Wee1 en una reacción detectable;

b) mantener la combinación de la etapa (a) en condiciones adecuadas para que Wee1 reaccione con dicho reactivo;

y

c) determinar la cantidad de Wee1 que reacciona con dicho reactivo, mediante lo cual la cantidad de reacción indica si dicho compuesto de prueba modula la actividad de Wee1.

15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que el reactivo es un cofactor para la reacción y que se modifica en la reacción de tal manera que puede medirse la cantidad de reacción.

16. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que el reactivo es un sustrato para la quinasa Wee1 y que se modifica en la reacción de tal manera que puede medirse la cantidad de reacción.

17. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que el reactivo es una enzima que utiliza por sí misma Wee1 como sustrato y que se modifica en la reacción de tal manera que puede medirse la cantidad de reacción.

18. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicho reactivo es un sustrato de quinasa marcado.

19. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicha determinación comprende medir la fosforilación de dicha proteína Wee1.

20. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicha determinación comprende medir la fosforilación de dicho reactivo.

21. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicho reactivo es proteína Cdc2.

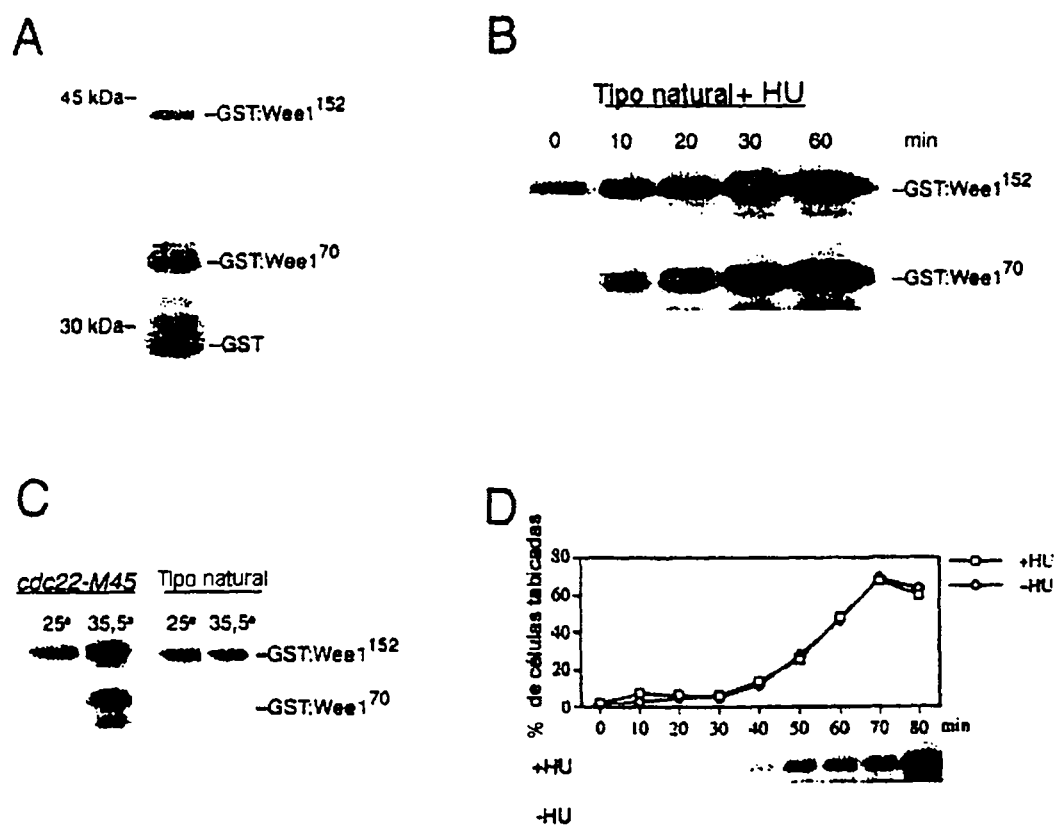


FIGURA 1

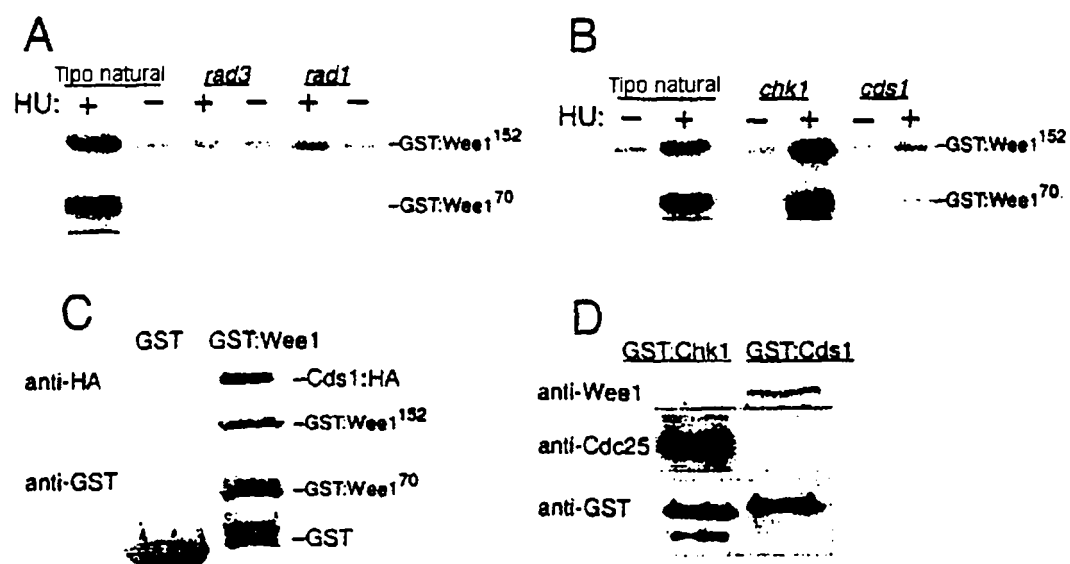


FIGURA 2

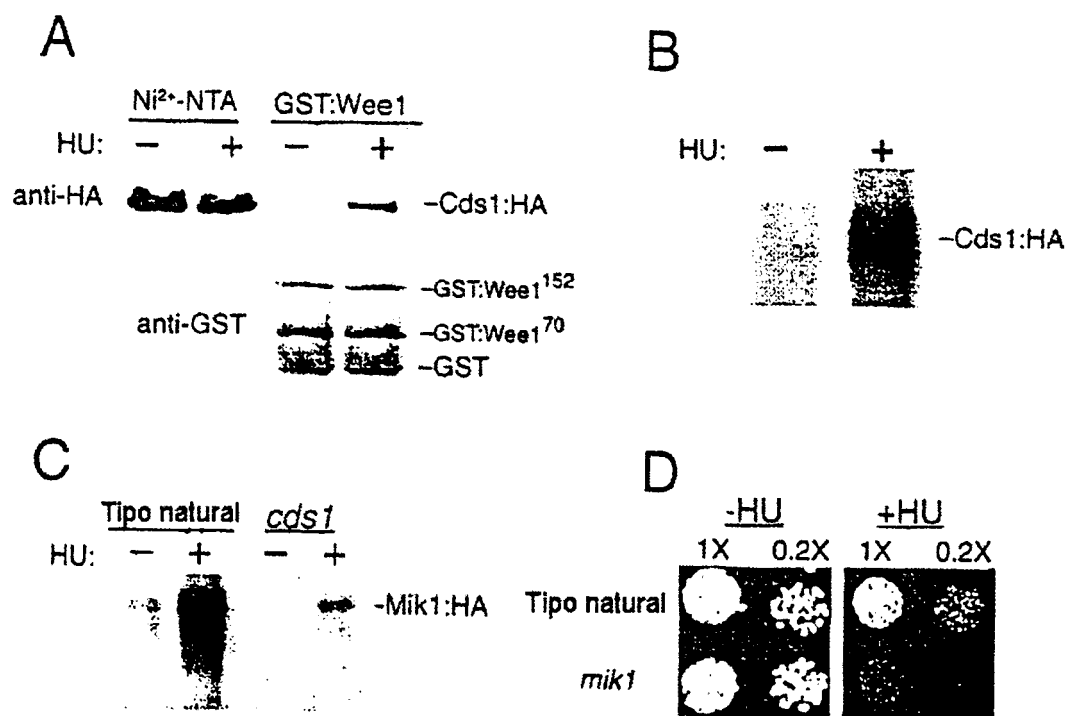


FIGURA 3

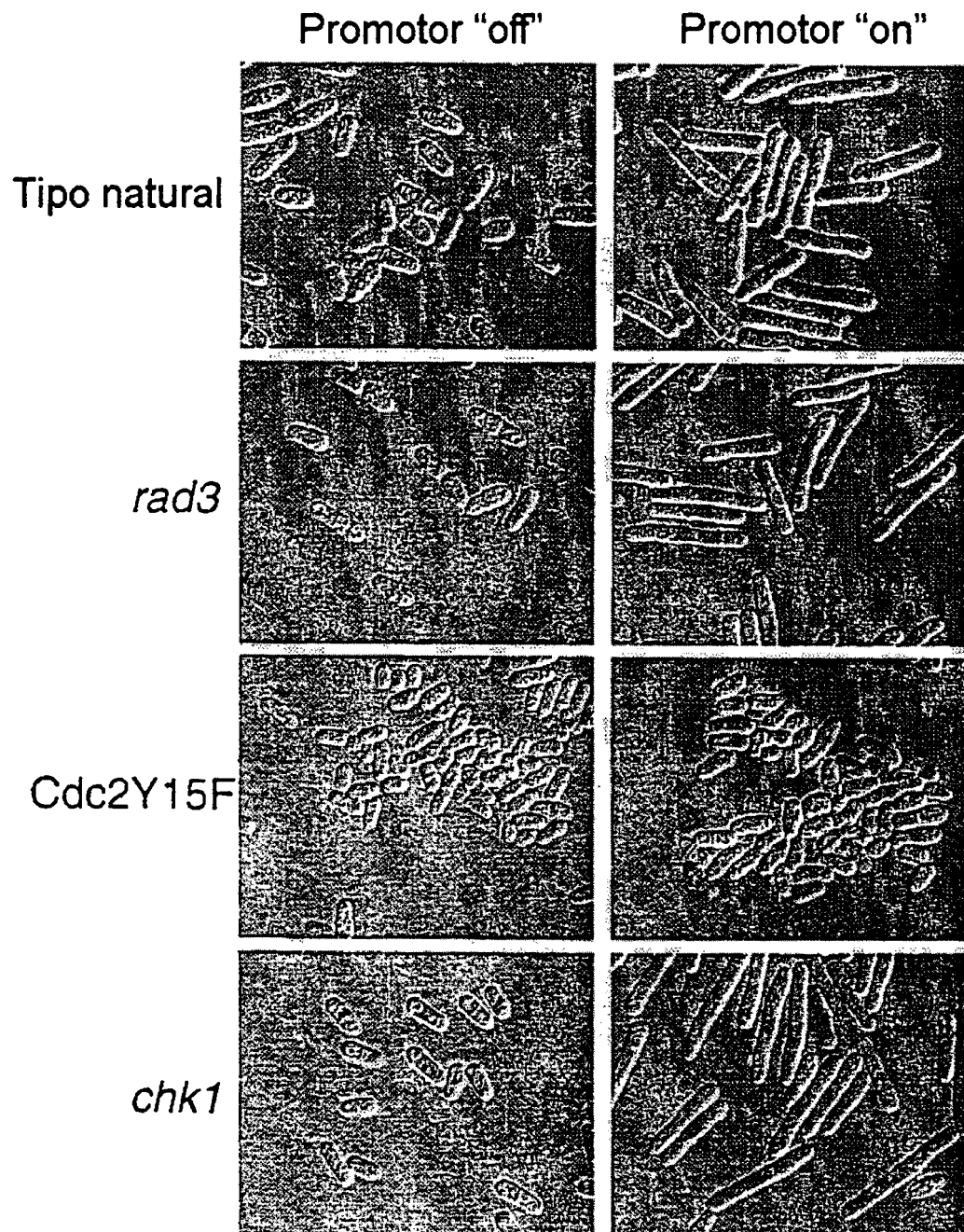
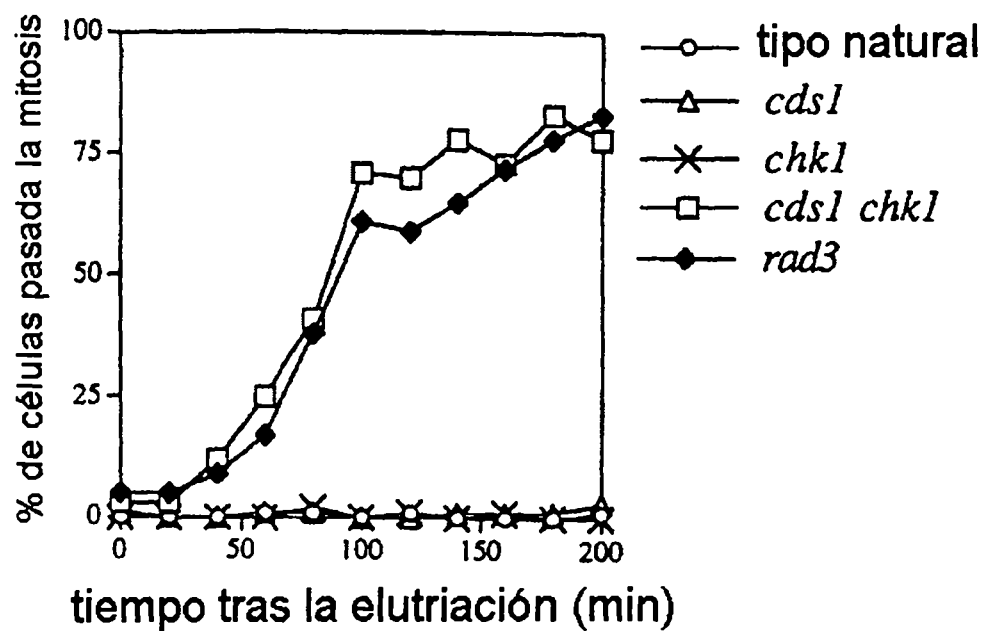


FIGURA 4

A



B

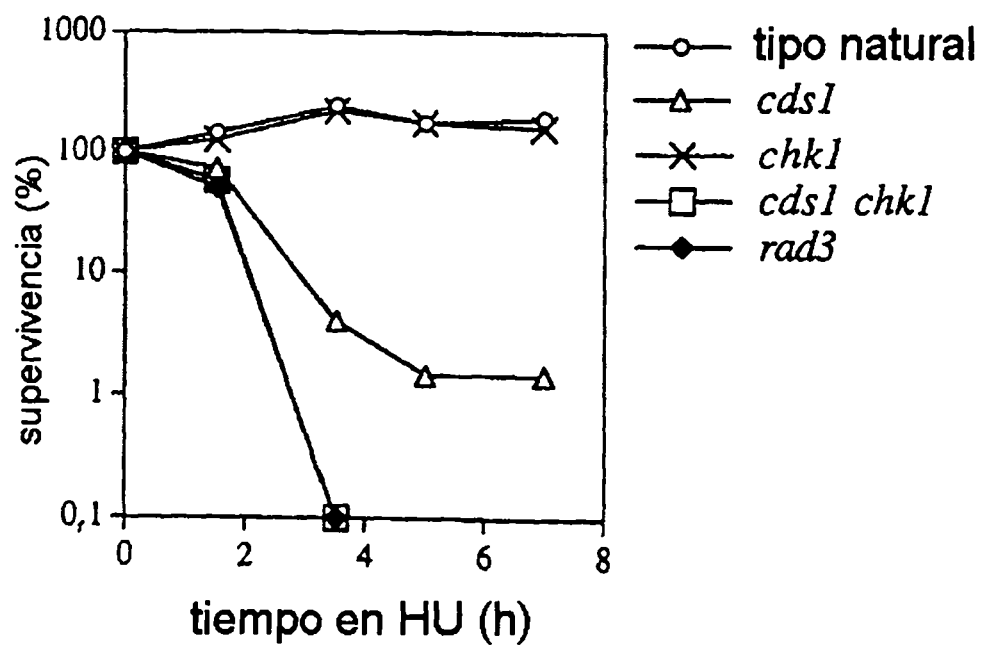


FIGURA 5

ES 2 286 882 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SCRIPPS

5 <120> COMPOSICIONES DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE QUINASA WEE1, SECUENCIAS DE NUCLEÓTI-
DOS, SISTEMAS DE EXPRESIÓN Y PROCEDIMIENTOS DE USO

10 <130> SCR2109S

<140> Documento PCT/US99/

<141> 26-03-1999

15 <150> Documento 60/079.752

<151> 27-03-1998

20 <160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

25 <211> 310

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: proteína de fusión sintética GST:Wee1 (11-72).

35 <400> 1

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

40 **Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu**
20 25 30

45 **Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu**
35 40 45

50 **Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys**
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

55 **Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu**
85 90 95

60 **Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser**

65

ES 2 286 882 T3

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

<210> 2

<211> 3175

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de nucleótidos sintética que codifica una proteína de fusión GST:Wee1 (11-72).

ES 2 286 882 T3

<400> 2

```

5      ggggcccgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgtttatttt 60
      tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 120
      aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccttt attccctttt 180
      ttgcccatt ttgccttcc ttttttgctc acccagaaac gctgggtgaa gtaaaagatg 240
10     ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 300
      tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gaggactttt aaagtctctg 360
      tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac 420
      actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcc acgaaagcat cttacggatg 480
15     gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcgt ccataacctt gagtataaac actgcggcca 540
      acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 600
      gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 660
      acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 720
20     gogaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggaataag 780
      ttgcaggacc acttctgccc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 840
      gagccgggtg gcgtgggtct cgggtatca ttgcagcact ggggocagat ggtaagccct 900
      ccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatatagc 960
25     agatcgctga gatagggtgc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1020
      catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1080
      tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1140
      cagaccccggt agaaaagatc aaaggatcct cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct 1200
30     gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc 1260
      taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1320
      ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1380
      tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgocagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1440
35     ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt 1500
      cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1560
      agcattgaga aagcgcaccg cttcccgaag ggagaaaggc ggcaggtat ccggttaagc 1620
      gcagggtcgg aacaggagag cgcacgagg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt 1680
40     atagtcctgt cgggtttcgc cactctgac ttgagcgtcg atttttgtg tgctcgtcag 1740
      gggggcggag cctatggaa aaacccagca acgcccctt tttacggttc ctggcctttt 1800
      gctggccttt tgcacacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataacgta 1860
      ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagt 1920
45     cagttagcga ggaagcggaa gagcgcctaa tacgcaaac gcctctccc ggcgttggc 1980
      cgattcatta atgcagctc gaggtctgca ccaatgcttc tggcgtcagg cagcoatcgg 2040
      aagctgtggt atggctgtgc aggtcgtaaa tcactgcta attcgtgtg ctcaaggcgc 2100
      actcccgctt tggataatgt tttttgcgcc gacatcataa cggttctggc aatatctctg 2160
50     aatgagctg ttgacaatta atcatcggct cgtataatgt gtggaattgt gagcgataa 2220
      caatttcaca caggaaacag tattcatgtc cctatacta ggttattgga aaattaagg 2280
      ccttggtcaa cccactcgac ttcttttggg atatcttga gaaaaatatg aagagcattt 2340
      gtatgagcgc gatgaagggtg ataatggcg aaacaaaaag tttgaattgg gtttgaggt 2400
55     tccaatctt ccttattata ttgatggtga tgttaatta acacagtcta tggccatcat 2460
      acgttatata gctgacaagc acaacatggt ggggtggtgt ccaaaagagc gtgcagagat 2520
      ttcaatgctt gaaggagcgg ttttgatat tagatacggg gtttcgagaa ttgcatatag 2580

```

ES 2 286 882 T3

```

taaagacttt gaaactctca aagttgattt tcttagcaag ctacctgaaa tgctgaaaat 2640
gttcgaagat cgtttatgtc ataaaacata tttaaatggt gatcatgtaa cccatcctga 2700
cttcatgttg tatgacgctc ttgatgttgt tttatacatg gacccaatgt gcctggatgc 2760
gttcccaaaa ttagtttgtt ttaaaaaacg tattgaagct atcccacaaa ttgatanga 2820
cttgaatatc agcaagtata tagcatggcc tttgcagggc tggcaagcca cgtttggtgg 2880
tggcgacct cctccaaaat cggatctggt tccgcgtgga tccccgggaa tttccggtgg 2940
tggtgggtgga attcatatga gatcttatgg cttacggcgg tcccaacgct ccatgaatct 3000
aaatcgtgct actttgctcg ctctccaac tccatcgagc ctgtatgatg ctaacaattc 3060
tacttcattc acctcttcgc aaaagccaaa tacctcttcc actagcttat tcggtcctcg 3120
caaacagacc acttctctcc ctctctcttc tcatgcgcgc cctcttcacc ctctt      3175

```

<210> 3

<211> 379

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: proteína de fusión sintética GST:Wee1 (11-152).

<400> 3

```

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1          5          10          15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20          25          30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35          40          45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50          55          60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65          70          75          80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85          90          95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100         105         110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
115         120         125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130         135         140

```

ES 2 286 882 T3

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

<210> 4

<211> 3867

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 286 882 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de nucleótidos sintética que codifica una proteína de fusión GST:Wee1 (11-152).

5

<400> 4

```

gcggccgctc aggtggcact ttccggggaa atgtgcgagg aacccttatt tgtttatatt 60
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgatma atgcttcaat 120
10 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccott attccctttt 180
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaanc gctggtgaaa gtanaagatg 240
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcamc agcggtaaga 300
tcottgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctg 360
15 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac 420
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 480
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtcg ccataaccat gagtataac actgoggcca 540
acttacttct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 600
20 gggatcatgt aactcgccct gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccnaacg 660
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgaaa ctattaactg 720
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcgatanaag 780
ttgcaggacc acttctgccc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gatnaatctg 840
25 gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccaagt ggttaagcct 900
cccgatctgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatatagc 960
agatcgctga gatagggtgc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1020
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1080
30 tcotttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1140
cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaactc 1200
gctgottgca aacaaaaaaa ccacogctac cagcgggtgtt ttgtttgcg gatcaagagc 1260
taocnaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1320
35 ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatadc 1380
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1440
ggttggaotc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt 1500
cgtgcacaca gcccgcttg gagcgaaaga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1560
40 agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacagggtat ccggttaagcg 1620
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaacgcc tggatatctt 1680
atagtcctgt cgggtttcgc cacotctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1740
gggggcgag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctggcctttt 1800
45 gctggccttt tgctcacatg ttctttctcg cgttatcccc tgattotgtg gataaccgta 1860
ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1920
cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgnaaacc gcotctcccc gcgcttggc 1980
cgattcatta atgcagctc gaggtctgca ccaatgcttc tggcgtcagg cagccatcgg 2040
50 aagctgtggt atggctgtgc aggtcgtaaa tcaactgata attcgtgtog ctcaaggcgc 2100
actccogtto tggataatgt tttttgogcc gacatcataa cggttctggc aaatattctg 2160
aaatgagctg ttgacaatta atcatcggtc cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa 2220
caatttcaca caggaaacag tattcatgtc ccotatacta ggttattgga aaattaaggg 2280
55 ccttggtgaa ccactcgac ttcttttgga atatcttgaa gaaaaatatg aagagcattt 2340

```

60

65

ES 2 286 882 T3

gtatgagcgc gatgaagggtg ataantggcg aaacaaaaag tttgaattgg gtttggagtt 2400
 tcccaatcct ccttattata ttgatgggtga tgttaaatta acacagtcta tggccatcat 2460
 acgttatata gctgacaagc acaacatgtt ggggtggtgt ccaaaagagc gtgcagagat 2520
 5 ttcaatgctt gaaggagcgg ttttggatat tagatacggg gtttcgagaa ttgcatatag 2580
 taaagacttt gaaactctca aagttgattt tcttagcaag ctacctgaa tgctgaaat 2640
 gttcgaagat cgtttatgtc ataaaaacata ttttaantgg gatcatgtaa cccatootga 2700
 cttcatgttg tatgacgctc ttgatgttgt tttatacatg gacccaatgt gcctggatgc 2760
 10 gttcccaaaa ttagtttgtt ttaaaaaacg tattgaagct atcccacaaa ttgataagta 2820
 cttgaaatcc agcaagtata tagcatggcc tttgcagggc tggcaagcca cgtttgggtgg 2880
 tggcgaccat cctccaaaat cggatctggg tccgcgtgga tcccgggaa tttccgggtgg 2940
 tgggtgggtga attcatatga gatcttatgg cttacggcgg toccaacgct ccatgaatct 3000
 15 aaatcgtgct actttgctcg ctctccaaac tccatcgagc ctgtatgatg ctaacnattc 3060
 tacttcatct acctcttcgc aaaagccaaa tacctcttto actagcttat tcggctcctcg 3120
 caaacagacc acttctctcc ctctctcttc tcatgccgac cctcttcacc ctctttctcc 3180
 tcttcttttt acacattoac aaccccagat acaggcacia cctgtacctc ggcggccttc 3240
 20 cctttttgat agacccaatc tggatatcac ctcttctct cggttaggtg attctocac 3300
 tctttctcct gttgoccagg tggctaacc catccaccat actgcccctt caccctcaga 3360
 cgttctgtcg tttccattc attaagcggc gcaagctta attggccctg caggcctgga 3420
 aggcacctc ctccatgatt gtgggcacc aggagcccag gctgctgtga gctgggtctg 3480
 25 ggacacttgg ccagagggga ttcttcctgt tggggtgca acagagccag gcagttccac 3540
 agaggcagg gagcaacagc aggagggcga acaggcccag gatgatgtgt agctccgacc 3600
 cctctggggg caaggtcatc agggtagga ctgtactgtt ggtggcccca gcctggctgg 3660
 cagccatgag gtggatgtga tacagactgg cgggctccag gccatggagg acaagccac 3720
 30 gggaggaggc attcaggatg gcggagaagg actggttctg agcgttggtc cagaagatgg 3780
 tgtagtgggt aagggggctc ttcccagct cagggggcto aggcacccac tocaggcctg 3840
 cagggccaat tctagatgac taagctt 3867