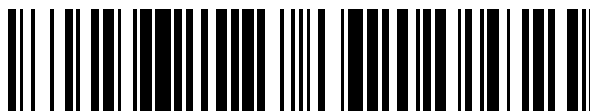


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 632**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05760055 .3**  
96 Fecha de presentación: **21.04.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1742964**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2007**

54 Título: **PÉPTIDO CAPAZ DE ALTERAR LA POLIMERIZACIÓN DE LA TUBULINA Y SU UTILIZACIÓN PARA INHIBIR LA PROLIFERACIÓN CELULAR.**

30 Prioridad:  
**04.05.2004 FR 0404742**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.03.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITE D'ANGERS  
40, RUE DE RENNES  
49000 ANGERS, FR;  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) y  
McGill University**

72 Inventor/es:  
**BOCQUET, Arnaud;  
EYER, Joël y  
PETERSON, Alan**

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireia**

**ES 2 375 632 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Péptido capaz de alterar la polimerización de la tubulina y su utilización para inhibir la proliferación celular.

5 La presente invención tiene por objeto un péptido procedente de filamentos intermedios y un fragmento de filamento intermedio capaces de alterar la polimerización de la tubulina y utilizados para inhibir la proliferación celular, y más particularmente para la obtención de medicamentos destinados a prevenir o tratar las enfermedades que implican una proliferación celular, tal como por ejemplo los cánceres.

10 La división celular, o mitosis, es el proceso que permite que las células se multipliquen con el fin de construir o regenerar los tejidos y sustituir las células muertas. En las células cancerígenas, la regulación de este proceso falla, por lo cual estas células se dividen de manera anárquica y crean así tumores. Una de las vías terapéuticas eficaz para luchar contra los cánceres consiste en bloquear la división de las células cancerígenas.

15 Las moléculas antimitóticas actuales (Taxol o Colchicina) actúan sobre todas las células sin distinción y provocan por consiguiente numerosos efectos secundarios.

Por lo tanto, es esencial desarrollar unas moléculas antimitóticas, es decir moléculas que bloquean la división de las células cancerígenas, que comprenden muchos menos efectos secundarios.

20 La tubulina es una molécula fundamental del proceso de la división celular. En efecto, ésta se polimeriza para formar los microtúbulos que son indispensables para el transporte intracelular durante la mitosis.

25 Los microtúbulos son uno de los elementos más importantes del citoesqueleto axonal en el que desempeñan un papel esencial en el transporte axonal funcionando como raíles a lo largo de los cuales los organelos se mueven en las dos direcciones anterógradas y retrógradas gracias a proteínas locomotoras específicas. Los microtúbulos están en equilibrio dinámico con los dímeros de tubulina y su acoplamiento está regulado en gran medida gracias a la asociación de las proteínas adicionales que permiten aumentar o reducir la estabilidad de los microtúbulos, como por ejemplo las proteínas MAP (revisión por Mandelkow y Mandelkow, 1995), las proteínas STOP (Guillaud *et al.*, 1998) y las proteínas OP18 (Cassimeris, 2002). Los axones dependen de los microtúbulos para el transporte axoplásmico y de los neurofilamentos para su crecimiento radial.

35 Los neurofilamentos (NF) son la clase mayoritaria de los filamentos intermedios expresada por las neuronas maduras (Hoffman *et al.*, 1987). Están compuestos por tres subunidades codificadas independientemente, los neurofilamentos ligeros (NFL), los neurofilamentos medios (NFM) y los neurofilamentos pesados (NFH) de 68, 150 y 200 kDa respectivamente. El eje de cada neurofilamento está formado por unas subunidades NFL. Las subunidades NFM y NFH se fijan sobre este eje gracias a unas interacciones de tipo hélice-hélice situadas en sus dominios centrales. Los dominios carboxi-terminales de NFM y NFH forman unas proyecciones laterales particularmente largas que permiten las interacciones interfilamentos y la asociación de neurofilamentos con otros organelos (Hirokawa, 1982). El estado de fosforilación de las unidades KSP repetidas en estas proyecciones laterales (Julien y Mushynski, 1982; De Waegh *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1988) se conoce para modular la afinidad interfilamentos (Eyer y Leterrier, 1988), el espacio interfilamentos (Garden *et al.*, 1987), la interacción con la tubulina (Hisanaga e Hirokawa, 1990), la velocidad de transporte de los neurofilamentos (De Waegh *et al.*, 1992) y el crecimiento radial de los axones (Ohara *et al.*, 1993; Eyer y Peterson, 1994; Zhu *et al.*, 1997).

45 Se sabe que los filamentos intermedios tienen la particularidad de ser diferentes de un tejido a otro. Así, los neurofilamentos están presentes únicamente en las células neuronales, los gliofilamentos en las células gliales, los filamentos de desmina en las células musculares, y los filamentos de queratinas en las células de la epidermis.

50 De manera sorprendente e inesperada, los inventores han demostrado que unos fragmentos de filamentos intermedios pueden unir la tubulina y alterar la polimerización de los microtúbulos. Además, los inventores han demostrado que la utilización de un péptido que une la tubulina y que inhibe o desactiva la polimerización de los microtúbulos permite bloquear la división celular.

55 Además, dichos péptidos proceden de la secuencia de filamentos intermedios, los cuales son específicos del tejido. Estos péptidos no parecen por lo tanto provocar los efectos secundarios de moléculas anti-mitóticas actuales.

60 La invención tiene por lo tanto por objeto un péptido aislado, caracterizado porque consiste en un péptido que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100%, de identidad después de la alineación óptima con una secuencia seleccionada de entre

SEC ID nº 5 (FGYDPYFSTSYKRRYVETPRVHIS),  
 SEC ID nº 6 (YSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS),  
 SEC ID nº 7 (AYRRVPTETRSSF SRVSGSPSSGFRSQSWSRGSPSTVSS),  
 65 SEC ID nº 8 (RSAAGSSSGFHSWARTSVSSVSASPSRFRGAASSTDSDL),  
 SEC ID nº 17 (MSQAYSSSQRVSSYRRTFGGAPGFSLG),

SEC ID nº 18 (SSPVFPRAGFGTKGSSSSMSTRVYQVSRRTSGGAGGLGSLRSSRLGTTRAPSYGA),  
 SEC ID nº 19 (GSEVHTKKTVMIKTIETRDGE),  
 SEC ID nº 20 (MSTRSVSSSSYRRMFGGS),  
 SEC ID nº 21 (GGAYVTRSSAVRLRSSVPGVRLLO),  
 SEC ID nº 22 (SLPLVDTHSKRLLIKTVETR),  
 SEC ID nº 23 (MSIRVTQKSYKMSTSGPRAFSSRSFTSGPGARISSSSSFSRVGSSSSSFRGSMGT),  
 SEC ID nº 24 (QIKSLNNKFASFIDKVRFLEQ),  
 SEC ID nº 25 (SAGGSNTFSRRTTKAVVVKKIETRDGKLVSE),  
 SEC ID nº 26 (MERRRITSARRSYASETVVRGLGP),  
 SEC ID nº 27 (VRGLGPSRQLGTMPRFSLSRMTPPLPARVDFSLAGA),  
 SEC ID nº 28 (KSVSEGHKLRNIVVKTVMERD)

o uno de sus fragmentos biológicos artificial de por lo menos 5 aminoácidos capaz de alterar la polimerización de la tubulina.

Mediante la expresión "alterar la polimerización de la tubulina" se entiende o bien inhibir, o bien activar la polimerización de la tubulina.

En la presente invención, se entenderá designar por el término "péptido" asimismo los polipéptidos.

Ventajosamente, dicho péptido presenta por lo menos 90% de identidad después de la alineación óptima con una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 24, SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27 o SEC ID nº 28. De manera aún más ventajosa, dicho péptido presenta por lo menos 100% de identidad después de la alineación óptima con una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 24, SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27 o SEC ID nº 28, y sus combinaciones.

Mediante la expresión "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácido nucleico o de aminoácido, en el sentido de la presente invención, se entiende designar un porcentaje de nucleótidos o de residuos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después de la mejor alineación (alineación óptima), siendo este porcentaje puramente estadístico y siendo las diferencias entre las dos secuencias repartidas al azar y sobre toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de ácido nucleico o de aminoácido se realizan habitualmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, pudiendo ser realizada dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación". La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], por medio del método de búsqueda de identidad de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], por medio de programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o también mediante los programas de comparación BLAST N, o BLAST P, ClustaW).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o de aminoácido se determina comparando estas dos secuencias alineadas de manera óptima en la que la secuencia de ácido nucleico o de aminoácido a comparar puede comprender unas adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia para una alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las cuales el nucleótido o el residuo de aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Por ejemplo, se podrá utilizar el programa BLAST, "Blast 2 secuencias" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 séquences - a new tool for comparing protein and nucleotide séquences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, siendo los parámetros utilizados los proporcionados por defecto (en particular para los parámetros "open gap penaltie": 5 y "extension gap penaltie": 2; siendo la matriz seleccionada por ejemplo la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), siendo el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar calculado directamente por el programa.

Por secuencia de aminoácido que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácido de referencia, se prefieren las que presentan con respecto a la secuencia de referencia ciertas modificaciones, en particular una deleción, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, un truncamiento o alargamiento. En el caso de una sustitución, de uno o varios aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos están sustituidos con unos aminoácidos "equivalentes". La expresión "aminoácidos equivalentes" designa en este caso cualquier aminoácido susceptible de ser sustituido con uno de los aminoácidos de la estructura de base sin modificar por ello esencialmente las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y tales como se definirán a continuación, en particular en los ejemplos.

Estos aminoácidos equivalentes se pueden determinar basándose o bien en su homología de estructura con los aminoácidos a los que sustituyen, o bien en unos resultados de ensayos comparativos de actividad biológica entre los diferentes péptidos y/o entre los diferentes fragmentos de filamentos intermedios.

5 A título de ejemplo, se mencionan las posibilidades de sustitución susceptibles de ser llevadas a cabo sin que resulte en una modificación profunda de la actividad biológica del péptido modificado correspondiente. Se puede sustituir así la leucina por la valina o la isoleucina, el ácido aspártico por el ácido glutamínico, la glutamina por la asparagina, la arginina por la lisina, etc., siendo las sustituciones inversas posibles en las mismas condiciones. Por último, se  
10 contemplan asimismo las modificaciones de los aminoácidos (por ejemplo fosforilación, biotinilación, acetilación, etc.) que son susceptibles de hacer que la actividad biológica de estos péptidos resulte más eficaz.

La invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia seleccionada entre SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 24, SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27 o SEC ID nº 28.

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 5, denominado Neurofilament Light subunit-Tubulin Binding Site 1 (NFL-TBS1). Por NFL-TBS1, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la subunidad de neurofilamento de bajo peso molecular capaz de enlazar la tubulina.  
20

Por bajo peso molecular, se entiende entre 1 y 70 kDa, preferentemente 34 kDa.

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 6, denominado Neurofilament Light subunit-Tubulin Binding Site 2 (NFL-TBS2). Por NFL-TBS2, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la subunidad de neurofilamento de bajo peso molecular capaz de enlazar la tubulina.  
25

Por bajo peso molecular, se entiende entre 1 y 70 kDa, preferentemente 34 kDa.

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 7, denominado Neurofilament Medium subunit-Tubulin Binding Site (NFM-TBS). Por NFM-TBS, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la subunidad de neurofilamento de peso molecular medio capaz de enlazar la tubulina.  
30

Por peso molecular medio, se entiende entre 1 y 170 kDa, preferentemente 150 kDa.

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 8, denominado Neurofilament high subunit-Tubulin Binding Site (NFH-TBS). Por NFH-TBS, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la subunidad de neurofilamento de peso molecular elevado, capaz de enlazar la tubulina.  
35

Por peso molecular elevado, se entiende un peso molecular superior a 170 kDa, preferentemente 200 kDa.

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 17, denominado Desmine-Tubulin Binding Site (Des-TBS1). Por Des-TBS1, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la Desmina, capaz de enlazar la tubulina.  
40

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 18, denominado Desmine-Tubulin Binding Site (Des-TBS2). Por Des-TBS2, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la Desmina, capaz de enlazar la tubulina.  
45

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 19, denominado Desmine-Tubulin Binding Site (Des-TBS3). Por Des-TBS3, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la Desmina, capaz de enlazar la tubulina.  
50

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 20, denominado Vimentine-Tubulin Binding Site (Vim-TBS1). Por Vim-TBS1, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la Vimentina capaz de enlazar la tubulina.  
55

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 21, denominado Vimentine-Tubulin Binding Site (Vim-TBS2). Por Vim-TBS2, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la Vimentina capaz de enlazar la tubulina.  
60

La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 22, denominado Vimentine-Tubulin Binding Site (Vim-TBS3). Por Vim-TBS3, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la  
65

tubulina procedente de la Vimentina capaz de enlazar la tubulina.

5 La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 23, denominado Cytokeratine-Tubulin Binding Site (Ker-TBS1). Por Ker-TBS1, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la Citoqueratina, capaz de enlazar la tubulina.

10 La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 24, denominado Cytokeratine-Tubulin Binding Site (Ker-TBS2). Por Ker-TBS2, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la Citoqueratina, capaz de enlazar la tubulina.

15 La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 25, denominado Cytokeratine-Tubulin Binding Site (Ker-TBS3). Por Ker-TBS3, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de la Citoqueratina, capaz de enlazar la tubulina.

20 La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 26, denominado Glial Fibrillary Acidic Protein-Tubulin Binding Site (GFAP-TBS1). Por GFAP-TBS1, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de GFAP, capaz de enlazar la tubulina.

25 La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 27, denominado Glial Fibrillary Acidic Protein-Tubulin Binding Site (GFAP-TBS2). Por GFAP-TBS2, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de GFAP, capaz de enlazar la tubulina.

30 La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido de secuencia SEC ID nº 28, denominado Glial Fibrillary Acidic Protein-Tubulin Binding Site (GFAP-TBS3). Por GFAP-TBS3, se entiende designar el polipéptido responsable del enlace a la tubulina procedente de GFAP, capaz de enlazar la tubulina.

Según la presente invención, dichos péptidos se pueden obtener en particular mediante síntesis química peptídica clásica o por vía recombinante, conocidas por el experto en la materia.

35 Los métodos de preparación de los péptidos recombinantes son bien conocidos hoy en día por el experto en la materia y no se desarrollarán en la presente descripción. Entre las células que se pueden utilizar para la producción de estas proteínas recombinantes, se pueden citar en particular las células bacterianas, y más particularmente *E. coli*.

40 La medición de la alteración de la polimerización de la tubulina se lleva a cabo midiendo la turbidez (densidad óptica a 350 nm) de una suspensión de tubulina. Una disminución de por lo menos 1% de la turbidez es una señal de una inhibición de la polimerización de la tubulina.

45 La presente invención tiene asimismo por objeto un ácido nucleico aislado que codifica para uno de los péptidos según la presente invención.

Por ácido nucleico, se entiende designar según la presente invención ADN o ARN.

50 La invención tiene por lo tanto por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 29, SEC ID nº 30, SEC ID nº 31, SEC ID nº 32, SEC ID nº 33, SEC ID nº 34, SEC ID nº 35, SEC ID nº 36, SEC ID nº 37, SEC ID nº 38, SEC ID nº 39 o SEC ID nº 40.

Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 1, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5, denominado NFL-TBS1.

55 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 2, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6, denominado NFL-TBS2.

Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 3, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7, denominado NFM-TBS.

60 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 4, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8, denominado NFH-TBS.

65 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC

ID nº 29, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 17, denominado Des-TBS1.

5 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 30, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 18, denominado Des-TBS2.

10 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 31, que codifica un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 19, denominado Des-TBS3.

Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 32, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 20, denominado Vim-TBS1.

15 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 33, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21, denominado Vim-TBS2.

20 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 34, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, denominado Vim-TBS3.

25 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 35, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 23, denominado Ker-TBS1.

Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 36, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 24, denominado Ker-TBS2.

30 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 37, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 25, denominado Ker-TBS3.

35 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 38, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 26, denominado GFAP-TBS1.

40 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 39, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 27, denominado GFAP-TBS2.

45 Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 40, que codifica para un péptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 28, denominado GFAP-TBS3.

50 La presente invención tiene asimismo por objeto un vector que comprende un ácido nucleico según la presente invención. Dicho ácido nucleico se selecciona ventajosamente de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 29, SEC ID nº 30, SEC ID nº 31, SEC ID nº 32, SEC ID nº 33, SEC ID nº 34, SEC ID nº 35, SEC ID nº 36, SEC ID nº 37, SEC ID nº 38, SEC ID nº 39 y SEC ID nº 40.

55 Por vector se entiende designar según la presente invención un plásmido, un cósmido, un fago, un BAC (Bacterial Artificial Chromosome), un YAC (Yeast Artificial Chromosome) o cualquier otro fragmento de ADN capaz de replicarse en una célula.

60 La presente invención tiene asimismo por objeto una célula hospedante que se transforma por un ácido nucleico según la presente invención o un vector según la presente invención. Dicho ácido nucleico se selecciona ventajosamente de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 29, SEC ID nº 30, SEC ID nº 31, SEC ID nº 32, SEC ID nº 33, SEC ID nº 34, SEC ID nº 35, SEC ID nº 36, SEC ID nº 37, SEC ID nº 38, SEC ID nº 39 y SEC ID nº 40.

65 Por célula hospedante, se entiende designar, según la presente invención, tanto unas células eucariotas como procariontas. Entre las células eucariotas que convienen se pueden citar las células animales, vegetales, bacterianas, las levaduras, los hongos o las células embrionarias cepas (de ratón, de rata, humana, y de cualquier especie en general). En particular, tratándose de levaduras, se pueden citar las levaduras del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces* o *Hansenula*. Tratándose de células animales, se pueden citar las células

COS, CHO, C127, los huevos de *Xenopus*, etc. Entre los hongos, se pueden citar más particularmente, *Micromonospora*, *Aspergillus ssp.* o *Trichoderma ssp.* Como célula procariotas, se prefiere utilizar las bacterias siguientes *Actinomycetos*, y en particular *Streptomyces*, *E. coli*, o *Bacillus*.

5 Las células hospedantes según la presente invención pueden ser transformadas por cualquier método que permite introducir una secuencia nucleica extraña en una célula. Se puede tratar, en particular, de transformación, electroporación, conjugación, fusión de protoplastos, o cualquier otra técnica conocida por el experto en la técnica.

10 La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de producción de péptido recombinante según la presente invención, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a) cultivar una célula según la presente invención en un medio de cultivo y condiciones de cultivo apropiadas,
- b) recuperar dicho péptido a partir de las células o del medio de cultivo obtenido en la etapa a).

15 La presente invención tiene asimismo por objeto una composición farmacéutica que comprende un péptido según la presente invención y/o obtenido mediante un procedimiento según la presente invención, con un vehículo farmacéuticamente aceptable: por vehículo farmacéuticamente aceptable, se entiende designar, según la presente invención, los soportes y vehículos que se pueden administrar al ser humano o a un animal.

20 La presente invención tiene asimismo por objeto un péptido según la presente invención y/o obtenido mediante un procedimiento según la presente invención para una utilización para inhibir la proliferación celular y/o la movilidad celular.

25 Por proliferación celular, se entiende designar, según la presente invención, una sucesión de divisiones rápidas de células o de microorganismos. Por microorganismos, se entienden asimismo los endoparásitos.

30 Por células, se entiende en particular cualquier célula que tiene un citoesqueleto de microtúbulo, por ejemplo las células de un tejido determinado tal como el pulmón, el hígado, el pecho, o los vasos sanguíneos, pero también las células libres tales como los espermatozoides, los óvulos, o las plaquetas sanguíneas.

35 La división de células conduce a poblaciones celulares homogéneas, que pueden ser organizadas en tejidos o no organizadas en tejidos. Está a veces acompañada por la aparición de una cierta anarquía de estructura, que puede ir hasta la pérdida de la forma y de propiedades características. Unas proliferaciones de células se observan en particular durante los procesos de naturaleza inflamatoria o tumoral.

Este fenómeno, normal durante el desarrollo y crecimiento para la mayoría de los tejidos y de manera permanente para ciertas progenies celulares (elementos figurados de la sangre, línea espermática, etc.), se vuelve anormal en algunas condiciones; conduce a la formación de tejidos neoformados o neoplásicos.

40 Un proceso esencial para el crecimiento tumoral y que implica una proliferación celular es la angiogénesis. Un péptido según la invención puede por lo tanto ser utilizado en particular para inhibir la angiogénesis durante el crecimiento tumoral. Asimismo, el péptido según la presente invención se puede utilizar para inhibir la multiplicación bacteriana o la proliferación de ciertas plantas, como las algas o también los líquenes o unos hongos, que tienen un citoesqueleto de microtúbulo. Más particularmente, el péptido según la presente invención se puede utilizar para inhibir el desarrollo de parásitos y más particularmente de endoparásitos en la alimentación.

45 La tubulina, una vez polimerizada en microtúbulos desempeña un papel esencial en el transporte axonal que funciona como unos raíles a lo largo de los cuales los organelos se mueven en las dos direcciones anterógradas y retrógradas, gracias a unas proteínas locomotoras específicas. El péptido según la presente invención es capaz de atravesar la membrana celular. Además, como dicho péptido bloquea la polimerización de la tubulina en microtúbulo, y tiene la capacidad de fijarse a la tubulina, permite bloquear el transporte intracelular y la fijación de proteínas locomotoras.

50 Así, la presente invención tiene asimismo por objeto un péptido según la presente invención y/o obtenido mediante el procedimiento según la presente invención para una utilización para bloquear el transporte intracelular y/o la movilidad celular.

55 Además, dicho péptido bloquea la polimerización de la tubulina en microtúbulo enlazándose a la tubulina. Así, es posible, gracias a esta unión, marcar la tubulina y los microtúbulos por dicho péptido.

60 Así, la presente invención tiene asimismo por objeto un péptido según la presente invención y/o obtenido mediante el procedimiento según la presente invención para una utilización como marcador de la tubulina y de los microtúbulos.

65 La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de un péptido según la presente invención y/o obtenido mediante un procedimiento según la presente invención, para la obtención de medicamentos.

Según la presente invención, el medicamento está destinado a prevenir o tratar unas enfermedades que implican una proliferación celular y/o una motilidad celular.

5 Por enfermedades que implican una proliferación celular y/o una motilidad celular, se pueden citar por ejemplo, según la presente invención, los cánceres, las infecciones bacterianas o las enfermedades que implican una proliferación de ciertas plantas como las algas o también los líquenes o la soriasis.

Más particularmente, según la presente invención, el medicamento está destinado a prevenir o tratar unos cánceres.

10 Por cáncer, se entiende designar, según la presente invención, uno o varios tumor(es) compuesto(s) por células atípicas, caracterizados por un poder de crecimiento autónomo, una delimitación imprecisa, una capacidad de invasión de los tejidos y vasos próximos y una tendencia a diseminarse mediante la producción de metástasis.

15 Existen dos grandes categorías de tumores malignos: los carcinomas, de origen epitelial, y los sarcomas, de origen conjuntivo. Existen asimismo unos tumores embrionarios. El término cáncer es un término genérico que designa todas las formaciones neoplásticas malignas, sea cual sea su naturaleza histológica.

20 De manera aún más particular, según la presente invención, el medicamento está destinado a prevenir o tratar el cáncer del sistema nervioso, el cáncer de hígado, el cáncer de próstata o el cáncer de piel.

De manera preferida, según la presente invención, el cáncer es un cáncer del sistema nervioso.

25 Además, el péptido según la presente invención tiene un efecto a nivel de los sitios de interacción entre la tubulina y los filamentos intermedios, sitios susceptibles de ser mutados en unas enfermedades genéticas. En efecto, en el caso en el que la interacción entre la tubulina y un filamento intermedio es necesaria para la activación de una enzima (por ejemplo una cinasa o una fosfatasa durante la división normal), una mutación a nivel del sitio de interacción impide la activación de dicha enzima. La adición de un péptido normal permite entonces restablecer una interacción entre la tubulina y el péptido, y por lo tanto la activación de la enzima.

30 La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de un péptido según la presente invención y/o obtenido mediante un procedimiento según la presente invención para demostrar y/o ensayar *in vitro* unos productos susceptibles de bloquear la interacción entre la tubulina y dicho péptido.

35 La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de un fragmento de filamento intermedio capaz de alterar la polimerización de la tubulina seleccionado de entre la citoqueratina endoA que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 10, la periferina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 11, la internexina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 12, la GFAP que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 14, para la preparación de un medicamento destinado a prevenir o a tratar unas enfermedades que implican la proliferación celular y/o la movilidad celular.

50 La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de un fragmento de filamento intermedio capaz de alterar la polimerización de la tubulina, seleccionado de entre la citoqueratina endoA que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 10, la periferina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 11, la internexina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 12, la GFAP que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 14, para la preparación de un medicamento destinado a prevenir o tratar unas enfermedades que implican el transporte intracelular y la fijación de proteínas locomotoras.

60 La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de un fragmento de filamento intermedio capaz de alterar la polimerización de la tubulina, seleccionado entre la citoqueratina endoA que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 10, la periferina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 11, la internexina



que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 12, la GFAP que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 14, como marcador de la tubulina.

La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de un fragmento de filamento intermedio capaz de alterar la polimerización de la tubulina, seleccionado entre la citoqueratina endoA que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 10, la periferina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 11, la internexina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 12, la GFAP que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 14, para la obtención de medicamentos.

La presente invención tiene asimismo por objeto un fragmento de filamento intermedio según la presente invención, para la demostración y/o para ensayar *in vitro* productos susceptibles de bloquear la interacción entre la tubulina y dicho fragmento de filamento intermedio.

Más particularmente, un fragmento de filamento intermedio puede ser la citoqueratina endoA de secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 de secuencia SEC ID nº 10, la periferina de secuencia SEC ID nº 11, la  $\alpha$ -internexina de secuencia SEC ID nº 12, la GFAP de secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina de secuencia SEC ID nº 14.

Las secuencias SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10 son idénticas.

Según los análisis bioinformáticos, en particular utilizando el programa Clustal W (véase la tabla 1), existe una homología de secuencia entre la citoqueratina endoA que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 10, la periferina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 11, la  $\alpha$ -internexina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 12, la GFAP que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 14.

La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la descripción siguiente, que se refiere a un ejemplo que muestra que la tubulina y los neurofilamentos son parejas de unión, y se demuestra que esta interacción desempeña un papel crítico en la modulación de las dinámicas de los microtúbulos neuronales.

Evidentemente, este ejemplo se proporciona únicamente a título ilustrativo del objeto de la invención, a la que no limita de ninguna manera.

#### Leyenda de las figuras

Figura 1; la tubulina copurificada con los neurofilamentos a 4°C conserva sus propiedades de polimerizabilidad en microtúbulo y es una proteína asociada a las tres subunidades de los neurofilamentos.

(A): Utilizando unos anticuerpos dirigidos contra los diferentes isotipos de tubulina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ III,  $\gamma$  y poliglutamilada), se ha detectado la tubulina en cada una de las fracciones de una preparación clásica de neurofilamentos. A pesar de una incubación a 4°C o la presencia de colchicina, sistemáticamente se copurifica una gran cantidad de tubulina con los neurofilamentos.

(B): Cuando se observa en microscopía electrónica un sedimento P3 incubado a 4°C sin colchicina, no se detecta ningún túbulo en la rejilla de microscopía (datos no mostrados). Sin embargo, cuando esta preparación se incubaba a 37°C en presencia de GTP, se observan numerosos microtúbulos con los neurofilamentos. Algunos neurofilamentos están decorados por material amorfo que podría ser tubulina (barra; 100 nm).

(C): Se han incubado 40  $\mu$ g de NF durante 1 hora en presencia de tubulina purificada y después centrifugada a 100.000 g durante 30 minutos. Un análisis mediante transferencia Western de los sobrenadantes y sedimentos muestra que la tubulina presente en los sedimentos aumenta proporcionalmente con la cantidad de tubulina exógena añadida para la incubación hasta un límite, lo cual muestra que la interacción NF-tubulina es

saturable.

- (D): Las proteínas presentes en el sedimento P3 han sido separadas mediante SDS-PAGE y transferidas sobre una membrana de PDF y después incubadas con tubulina purificada sobre columna de fosfo-celulosa. Se han incubado después las membranas con un anticuerpo anti- $\beta$ III tubulina con el fin de proceder a una transferencia Western clásica. Los resultados muestran que la tubulina interactúa con bandas que corresponden a NFL, NFM, y la forma fosforilada de NFH, la  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, así como con la sinapsina\* y las MAP\*\* (1). Cuando se realiza un experimento similar en ausencia de tubulina, no se observa sólo una banda que corresponde a la  $\beta$ III-tubulina (2). Se ha hibridado la misma membrana (1) sucesivamente con los diferentes anticuerpos anti-NFL (3), anti-NFM (4), y anti-NFH (5). El anticuerpo anti-NFH reconoce las dos formas fosforiladas y no fosforiladas de NFH.

Figura 2: La tubulina se enlaza en el extremo N-terminal de cada una de las subunidades de neurofilamentos. Efecto de cada una de las secuencias que corresponden a este sitio de unión sobre la polimerización de los microtúbulos.

- (A): Se han incubado las membranas de péptido array tal como en el procedimiento descrito por Frank y Owerwin (1996) con tubulina purificada sobre columna de fosfo-celulosa toda la noche a 4°C. La tubulina fijada se ha revelado con un anticuerpo anti- $\beta$ III tubulina y un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa. La subunidad NFL contiene dos dominios de unión a la tubulina (denominados NFL-TBS1 y NFL-TBS2), mientras que NFM y NFH contienen una sola secuencia de unión de 39 aminoácidos (denominadas respectivamente NFM-TBS y NFH-TBS).
- (B): Cada uno de estos péptidos que corresponden al sitio de unión de la tubulina se han ensayado *in vitro* para su efecto sobre la polimerización de la tubulina en microtúbulos a diferentes concentraciones: 100  $\mu$ m (●), 30  $\mu$ m (◆), 10  $\mu$ m (▼), 3  $\mu$ m (▲) o sin péptido (■). (1): NFL-TBS1 (2): NFL-TBS2, (3): NFM-TBS y (4): NFH-TBS. (5): curva del efecto inhibitor de cada péptido en función del log de la concentración.

Figura 3: Fotos en microscopía electrónica de secciones transversales de axones de ratones control y transgénicos. Los neurofilamentos observados en los axones de ratones control están ausentes en los axones de ratones transgénicos (barra = 100 nm)

Figura 4: La cantidad de ARNm de  $\alpha$ -tubulina presente en los ratones control y NFHLacZ es la misma.

- (A): Durante el desarrollo, la cantidad de ARNm de tubulina M $\alpha$ 1 cae en un factor de 10 tanto en el cerebro como en la médula espinal. Un perfil de expresión similar se observa entre los dos genotipos.
- (B): Los porcentajes de ARNm de la tubulina M $\alpha$ 2 permanecen constantes durante el desarrollo, tanto en el cerebro como en la médula espinal, sin diferencia entre controles y transgénicos. (-: controles, +: transgénicos, 2D: 2 días, 4w: 4 semanas, ad: adultos, y n representa el número de cerebros y de médulas espinales utilizados para realizar los experimentos por triplicado).
- (C): Se han detectado unos ARNm de la tubulina M $\alpha$ 3/7 sólo en los testículos. No se ha detectado ninguna expresión ectópica.

Figura 5: La cantidad de ARNm de tubulina  $\beta$  sigue asimismo sin cambiar entre los ratones control (-) y transgénicos (+).

- (A): La cantidad de ARNm de tubulina M $\beta$ 2 disminuye tanto en el cerebro (factor de 3) como en la médula espinal (factor de 10) sin diferencia entre los ratones control y transgénicos.
- (B): Se han detectado unos ARNm de tubulina M $\beta$ 3 a niveles similares en los ratones transgénicos y control.
- (C): Los ARNm de tubulina M $\beta$ 4 tienen un perfil bifásico en el cerebro y la médula espinal. En primer lugar, el porcentaje de ARNm aumenta entre los estados 2 días y 4 semanas en un factor de 3 en el cerebro y de 5 en la médula espinal. Después, el porcentaje disminuye en un factor de 2 en el cerebro y la médula espinal sin mayor diferencia entre los ratones control y transgénicos.
- (D-E): Se han identificado dos transcritos para la tubulina M $\beta$ 5 en el cerebro y la médula espinal. Su perfil de expresión es similar entre los ratones control y transgénicos. Durante el desarrollo, los dos transcritos ven disminuir su cantidad en un factor de 10. El transcrito más grande (2,8 Kb) está expresado diez veces más que el transcrito de 1,8 kb.
- (F): Se observa una disminución en un factor de 5 en el cerebro y de 3 en la médula espinal para el porcentaje de ARNm de la tubulina M $\beta$ 6. Este transcrito se observa sobre todo durante los estados precoces del desarrollo sin diferencia entre los dos genotipos.

Figura 6: La cantidad de tubulina presente en los homogenados tisulares de los ratones control y transgénicos no es diferente.

- 5 (A): La cantidad de tubulina presente en los extractos brutos de cerebro (B), médula espinal (SC) y nervios ciáticos (SN) de ratón control y transgénicos es la misma.
- (B): La cantidad de tubulina presente en las diferentes fracciones de una preparación clásica de microtúbulos es idéntica entre los ratones control y transgénicos.
- 10 (C, D): Con el fin de evaluar la capacidad de polimerización de la tubulina de los ratones control y transgénicos se han incubado los sobrenadantes S1 de cerebros control y transgénicos durante 1 hora a 37°C en presencia de GTP o en presencia de Taxol para provocar la polimerización de los MT (C), o en frío o en presencia de colchicina para inducir la despolimerización de los microtúbulos. (D). Después de una centrifugación a 100.000 g en las mismas condiciones, se han analizado los sobrenadantes y sedimentos mediante transferencia Western con la ayuda de un panel de anticuerpos dirigidos contra las diferentes tubulinas. No existe ninguna diferencia entre los ratones control y transgénicos.
- 15

Figura 7: En microscopía electrónica, no se observa ningún microtúbulo en los agregados de neurofilamentos a pesar de la presencia de epítomos de tubulina demostrados mediante inmunofluorescencia acoplada a la microscopía confocal.

20

- (A): Fotos de microscopía electrónica de un agregado de neurofilamento presente en el cuerpo celular de una moto-neurona de ratón. No se puede observar ningún microtúbulo. (Barra: 200 nm).
- 25 (B): Análisis inmunohistoquímico acoplado a la microscopía confocal de médulas espinales de ratones control y NFHLacZ con la ayuda de anticuerpos dirigidos contra la tubulina  $\beta$ III y la periferina. Las dos redes de neurofilamentos y de microtúbulos están co-localizadas en el cuerpo celular de los ratones control. A pesar de la ausencia de microtúbulos en el cuerpo celular, los agregados de neurofilamentos contienen unos epítomos de tubulina (barra: 12,5  $\mu$ m).
- 30

Figura 8: Efecto de los péptidos NFL-TBS (SEC ID nº 6) sobre el citoesqueleto de los microtúbulos, y sobre la división celular.

- 35 (A-A'-A'"): Las células T98G son tratadas con los péptidos SEC ID nº 6 (10  $\mu$ M) durante 6 horas, y los microtúbulos son detectados a continuación utilizando un anticuerpo anti-tubulina (rojo) y los péptidos SEC ID nº 6 biotinilados son detectados utilizando avidina marcada con Alexa (verde). Las células que contienen los péptidos carecen de red típica de microtúbulo y tienen una forma redonda mientras que las células normales tienen una red normal de microtúbulos.
- 40 (B-B'): Análisis en citometría de flujo de las células control y de las células tratadas con los péptidos SEC ID nº 6. Las células T98G tratadas con los péptidos SEC ID nº 6 (10  $\mu$ M) durante 48 horas muestran una parada fuerte en fase G1 comparada con las células control.
- 45 (C): Prueba de ensayo de proliferación de células T98G con los péptidos SEC ID nº 6: la proliferación de células tratadas con el péptido (10  $\mu$ M 48 horas) está fuertemente reducida con respecto a las células control no tratadas.

Figura 9 (A, B, C, D):

50

Utilizando el mismo enfoque experimental que el descrito para los chips peptídicos de neurofilamento, se han ensayado los chips peptídicos que corresponden a la secuencia de otros filamentos intermedios (A. desmina, B. vimentina, C. citoqueratina y D. GFAP) para demostrar la presencia eventual de sitio de unión a la tubulina. Cada filamento intermedio contiene tres sitios de unión a la tubulina (alineación de 2 puntos o más). Dos sitios están localizados en el dominio N-terminal y uno en el dominio C-terminal.

55

Figura 10 (A, B, C, D, E):

- 60 Influencia de los péptidos Vim-TBS3 (SEC ID nº: 22), GFAP-TBS3 (SEC ID nº: 28), Ker-TBS1 (SEC ID nº: 23), Vim-TBS2 (SEC ID nº: 21) y GFAP-TBS 1 (SEC ID nº: 26) sobre la polimerización de los microtúbulos. Utilizando el mismo enfoque experimental que el descrito para los péptidos TBS procedentes de los neurofilamentos, se ha ensayado la influencia sobre la polimerización de los microtúbulos para A. Vim-TBS3 (SEC ID nº: 22) B. GFAP-TBS3 (SEC ID nº: 28), C. Ker-TBS1 (SEC ID nº: 23), D. Vim-TBS2 (SEC ID nº: 21) y E. GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26)

Figura 11:

Efecto del péptido GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26) sobre la división celular. Análisis en citometría de flujo de las células control y de las células tratadas con el péptido GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26). Las células T98G tratadas con el péptido GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26) (100 µM) durante 36 horas muestran una parada fuerte en fase G1 en comparación con las células control.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### I. Introducción

Se proporciona en este caso una prueba *in vitro* e *in vivo* de que la tubulina y los neurofilamentos son parejas de unión y se demuestra que esta interacción desempeña un papel crítico en la modulación de la dinámica de los microtúbulos neuronales. En primer lugar aplicando series de técnicas bioquímicas clásicas, se ha demostrado que la tubulina no polimerizada se co-purifica con los neurofilamentos ensamblados, e interactúa directamente con las tres subunidades de neurofilamentos. Se ha utilizado a continuación un microscopio electrónico para mostrar que la tubulina no polimerizada asociada con los neurofilamentos guarda una capacidad total para ensamblarse en microtúbulos. Para estudiar la extensión y el significado *in vivo* de esta asociación, se han utilizado unos ratones transgénicos que expresan el transgén NFHLacZ. Estos ratones expresan niveles bajos de proteínas de fusión NFH-β-galactosidasa que reticula los neurofilamentos que causan el secuestro del citoesqueleto de neurofilamentos en agregados pericariales. Se ha demostrado en este caso que ni la presencia de agregados pericariales, ni la ausencia de neurofilamentos en los axones de ratones transgénicos NFHLacZ (Eyer y Peterson, 1994) afectan a la acumulación de ARNm de los diferentes isotipos de tubulinas. De manera similar, ni la cantidad total de proteína de tubulina recuperada a partir de los axones ni su potencial de polimerización se han alterado en dichas neuronas. Sin embargo, los axones deficientes en neurofilamentos tienen un crecimiento radial atenuado que alcanza sólo un calibre de 50% con respecto a la normal y en consecuencia su concentración en tubulina relativa es atípicamente fuerte. En coherencia con su fuerte concentración en tubulina, el número y la densidad de microtúbulos en dichos axones son superiores a la normal. Sin embargo, el número absoluto y la densidad absoluta de microtúbulos exceden en mucho lo que se ha predicho mediante el aumento de la concentración en tubulina sola y define por lo tanto un papel principal para los neurofilamentos en la regulación de la dinámica de los microtúbulos axonales. A la inversa, en el interior de los agregados de neurofilamentos densos que se forman en la pericaria neuronal de ratones NFHLacZ, los epítomos de tubulina están presentes pero los perfiles de microtúbulos no han podido ser identificados. Estas observaciones combinadas demuestran que los neurofilamentos y la tubulina no polimerizada son las parejas de unión mayoritarias y que esta interacción afecta a las dinámicas *in vivo* de los microtúbulos. Dicha integración del citoesqueleto puede desempeñar un papel en la escultura de la morfología axonal con efectos consecuentes en la función de fibras, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

#### II. Material y método

##### 1. Análisis informático

Las alineaciones de secuencia se han llevado a cabo con ClustalW y se han corregido manualmente. El dominio central muy conservado de cada filamento intermedio se ha utilizado para el anclaje de la alineación. La tabla 1 se ha llevado a cabo con el programa Genedoc.

##### 2. Análisis de los ARNm mediante transferencia Northern

Se han extraído los cerebros y las médulas espinales sobre ratones transgénicos NFHLacZ y ratones control, de 2 días, 4 semanas, 6 meses y 18 meses, y después se han congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y se han almacenado a -80°C. Se han extraído los ARN totales según el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Se han utilizado 10 µg de ARN de cada muestra para efectuar una electroforesis sobre gel al 1,2% de agarosa, que contiene 2,2 M de formaldehído, y se han transferido mediante aspiración sobre una membrana de Nylon Nytran N (Schleicher y Schuell). Se han enlazado los ARN de manera covalente a la membrana mediante una exposición a los UV. Las membranas se han prehibridado con el tampón (Quick-Hyb" (Stratagene) durante 20 minutos a 68°C, después se han hibridado durante una hora a 68°C con sondas de ADNc, previamente marcadas mediante cebador aleatorio con <sup>32</sup>P-dCTP (Amersham, 3000 Ci/mmol), y después se han lavado a temperatura ambiente en 2XSSC, 0,1%SDS (2 x 15 minutos), y a 60°C en 0,1 x SSC, 0,1% SDS (3 x 15 minutos). Se ha cuantificado la transferencia Northern utilizando un Phosphorimager (Molecular Dynamics) y después se ha expuesto a unas películas autorradiográficas (Biomaz MR; Kodak) a -80°C.

Se han utilizado como sondas de control un ADNc de 1,4 kb cortado por EcoRI e HindIII del gen de la GAPDH (Fort *et al.*, 1985) y uno de 0,5 kb cortado por EcoRI e HindIII del gen de HSS-26 (Vincent *et al.*, 1993). Para analizar la codificación de los ARNm de cada isotipo de tubulina (Lewis *et al.*, 1985; Villasante *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986), se han generado unas sondas específicas a partir de las secuencias 3' no traducidas en el vector pUC mediante

PCR utilizando los cebadores pUC (5'-3' CTGCAAGGCGATTAAGTTGG y GTTGTGTGGAATTGTGAGCG).

La intensidad relativa de las bandas se ha medido utilizando un Phosphorimager (Molecular Dynamics). Los ARNm aislados a partir de los cerebros de los animales control de 2 días se han utilizado como referencia y se han definido arbitrariamente como 1. Se han realizado unas excepciones para los ARNm de tubulina  $\alpha$ 3/7 y  $\beta$ 1 aislados de los testículos y del bazo de los ratones adultos control, a causa de su ausencia de expresión en los demás tejidos. Los valores de GAPDH no muestran ninguna variación de expresión entre los valores de los animales control y de los animales transgénicos (Robert *et al.*, 2001). Además, para cada transferencia Northern, se han calculado unos factores de corrección que igualan los valores de GAPDH para normalizar los niveles de ARNm. Los valores medios de los diferentes experimentos en cada etapa postnatal se han calculado y expresado como mediana +/- el error estándar.

### 3. Aislamiento de los microtúbulos, de la tubulina y de los neurofilamentos

Los cerebros, las médulas espinales o los nervios ciáticos, se han disecado a partir de ratones adultos, pesados y homogeneizados en tampón RB (mM MES, pH 6,8, 1 mM EGTA y 1 mM MgCl<sub>2</sub>). Los homogenizados se han centrifugado a 10<sup>5</sup> g a 4°C durante 1 hora en una ultracentrifugadora Beckman LE-80k o TLX100. Para el aislamiento de los microtúbulos, el primer sobrenadante (S1) se ha incubado con 4M de glicerol y 0,1 mM de GTP a 37°C durante 1 hora, y después se ha centrifugado a 10<sup>5</sup> g a 37°C para recuperar los microtúbulos polimerizados y los neurofilamentos en el segundo sedimento de centrifugación (P2).

Los microtúbulos y los neurofilamentos presentes en el sedimento (P2) se han suspendido en tampón RB, se han incubado a 4°C durante 1 hora para despolimerizar los microtúbulos y se han centrifugado a 10<sup>5</sup> g a 4°C durante 1 hora. La fracción de tubulina no polimerizada se ha recuperado en el tercer sobrenadante (S3) mediante paso sobre una columna de fosfocelulosa tal como ha sido descrito por Weingarten *et al.*, 1975. Para la purificación de los neurofilamentos, se ha utilizado un protocolo similar, pero no se ha adicionado el GTP, y se han realizado todas las etapas a 4°C para prevenir la polimerización en microtúbulo, tal como se ha descrito anteriormente por Leterrier y Eyer (1987).

### 4. Cuantificación de proteínas y análisis mediante transferencia Western

El kit de dosificación BCA (Pierce) se ha utilizado para cuantificar las proteínas de cada fracción. Las proteínas se separaron de manera subsecuente mediante un gel SDS-PAGE a 7,5% según Laemmli, (1970), y se revelaron mediante azul de Coomassie. De manera alternativa, las proteínas separadas en geles similares se han transferido sobre membranas de nitrocelulosa (Immobilon, Millipore). Para análisis de inmunodetección (Towbin *et al.*, 1979), se han identificado las subunidades de neurofilamentos utilizando unos anticuerpos monoclonales anti-NFH, anti-NFM y anti-NFL (Sigma N5389, N5264, N5139), y un anticuerpo policlonal anti-NHF (Sigma N4142). Los isotipos de tubulina se han identificado utilizando unos anticuerpos que reconocen la  $\alpha$ -tubulina, la  $\beta$ -tubulina, la tubulina  $\beta$ III-específicamente neuronal, la  $\gamma$ -tubulina (Sigma T9026, T4026, T8660) y unos epítomos de tubulina poli-glutamilados (GT335).

Se han efectuado los experimentos por triplicado y se han hibridado todas las membranas con cada anticuerpo y se han deshibridado entre cada hibridación, según las instrucciones del proveedor. Cada reacción se ha revelado utilizando un protocolo quimioluminiscente (ECL, Amersham). Para evaluar la intensidad de la reacción, las películas expuestas se han escaneado y cuantificado midiendo la superficie y la densidad de cada mancha con el programa ImageQuant (Molecular Dynamics) o NIHImage. Para cada experimento, se ha utilizado la señal de la muestra de control como referencia.

### 5. Precipitación de la tubulina con los neurofilamentos

Se ha incubado una cantidad igual de neurofilamentos (40  $\mu$ g) con diferentes cantidades de tubulina purificada durante 1 hora a 4°C y después se ha centrifugado durante 30 minutos a 100.000 g a la misma temperatura. El sobrenadante y los sedimentos resuspendidos (en RB) se han almacenado a -20°C antes del análisis mediante transferencia Western.

### 6. Chip peptídico sobre membrana y péptidos sintéticos.

Se han obtenido unos chips peptídicos que corresponden a las subunidades de neurofilamentos NFL, NFM y NFH según Frank *et al.*, 1992, con un robot ASP automat spot. Se ha dividido cada secuencia de neurofilamento en secuencias de 15 aminoácidos.

Estos péptidos solapan 12 aminoácidos del péptido siguiente. Se han sintetizado los péptidos solapantes sobre unas manchas, como un chip, sobre una membrana de celulosa especialmente producida (AIMS scientific product, GmbH, Braunschweig, Alemania). Los péptidos se unen a la membrana con un puente de polietilenglicol gracias a su aminoácido carboxi-terminal. El procedimiento de síntesis seguido es el de Frank *et al.* 1996.

7. Experimentos de transferencia overlay

Las proteínas presentan en el tercer sedimento (P3) de una preparación de microtúbulos típica (que está enriquecida en neurofilamentos), se han separado sobre un gel SDS-Page al 7,5%, y después se han transferido sobre membrana de nitrocelulosa, según Towbin *et al.* (1979). Se han cortado las membranas en bandas, y se han bloqueado con TBS (1x) que contiene 10% de leche en polvo. Se han incubado estas bandas durante una noche a 4°C con la tubulina purificada. Después de un lavado extensivo con TBS (1x), se han inmunomarcado las membranas con anticuerpos anti- $\beta$ III-tubulina o anti- $\alpha$ -tubulina con el fin de revelar las proteínas que interactúan con la tubulina. Después, se han deshibridado las mismas membranas y se han rehibridado con nuevos anticuerpos con el fin de confirmar la naturaleza de las bandas que han sido reconocidas por la reacción a la tubulina y a la anti-tubulina.

De manera alternativa, las bandas que han sido reveladas se han cortado y analizado mediante espectrometría de masas. El chip peptídico sobre membrana se ha incubado durante una noche a 4°C con la tubulina purificada. Después de un lavado extensivo con TBS (1x), se han incubado las membranas con anticuerpos anti- $\beta$ III-tubulina con el fin de revelar las secuencias de aminoácidos que interactúan con la tubulina.

8. Análisis de espectrofotometría de la polimerización de los microtúbulos

La polimerización de la tubulina a partir del sobrenadante S3 de una preparación de microtúbulos se ha estudiado mediante turbidimetría. Brevemente, el sobrenadante S3 (3 mg/ml) se ha incubado a 37°C en presencia de 1 mM de GTP en un espectrofotómetro termoespectrónico Helios  $\alpha$  para seguir las variaciones de densidad óptica a 350 nm.

9. Análisis inmunohistoquímicos en microscopía confocal

Los ratones se han sacrificado mediante inyección de una dosis letal de anestésico con avertina (8 mg/kg), y después se han perfusionado de manera trans-cardiaca en un primer tiempo con 50 ml de tampón fosfato con el fin de eliminar la sangre, seguido de 50 ml de 4% de paraformaldehído en tampón de fosfato.

Se han recuperado las muestras, se han post-fijado en el mismo tampón de fijación durante una hora, y después se han transferido en una disolución al 30% de sacarosa antes de ser congeladas en isopentano a -40°C y almacenadas a -80°C. Se han preparado las secciones de criostato (10  $\mu$ m), se han colocado en láminas y se han almacenado a -80°C para análisis inmunohistoquímicos. Se han llevado las láminas a temperatura ambiente y se han aclarado 3 veces con tampón fosfato antes de ser bloqueadas a temperatura ambiente durante 2 horas con 5% de suero de albúmina bovina (BSA) para los anticuerpos anti-neurofilamentos, o 5% de BSA más 5% de suero de cabra para los anticuerpos anti-tubulina. Las secciones se han aclarado tres veces, durante 5 minutos con tampón fosfato y se han incubado durante una noche con los anticuerpos primarios (en 1% de tampón fosfato de BSA).

Después, las secciones se han aclarado tres veces durante 5 minutos cada una y se han incubado con anticuerpos secundarios fluorescentes (Alexa 488 nm de anticuerpo anti-ratón, y Alexa 568 nm de anticuerpo anti-conejo de Molecular Probes, diluido al 1/200). Se ha incubado cada anticuerpo consecutivamente durante una hora y media y después se ha aclarado tres veces durante 5 minutos.

Se han fijado las láminas con un medio anti-envejecimiento y se han almacenado a 4°C en la oscuridad antes de la observación. Los anticuerpos primarios y las diluciones se han utilizado de esta manera: los anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -tubulina, anti- $\beta$ -tubulina y anti- $\beta$ III-tubulina se han diluido a 1:100; los anticuerpos policlonales anti-NFH y anti-periferina se han diluido a 1:1000 y 1/100 respectivamente. Las láminas inmunomarcadas se han analizado con un microscopio confocal Olympus (Bx50) utilizando el programa Olympus Fluoview 3.0.

10. Microscopía electrónica y cuantificación.

El análisis mediante microscopía electrónica se ha efectuado según los protocolos descritos anteriormente (Eyer y Peterson, 1994). La densidad de los microtúbulos axonales se ha evaluado escaneando los negativos de micrografía electrónica (tomados a 25000x utilizando un microscopio electrónico JEOL JEM2010) de los axones seleccionados de manera aleatoria de cada genotipo utilizando un escáner U-MAX/ASTRA2400S. Las imágenes se han importado a un ordenador 8600 PowerPC/Macintosh utilizando Photoshop. La densidad de los microtúbulos se ha evaluado contando el número de microtúbulos/hexágono tal como ha sido descrito por De Waegh *et al.*, 1992.

III Resultados

1 La tubulina no polimerizada se co-aísla con los neurofilamentos (figura 1)

Se aíslan unos neurofilamentos de cerebros o de médulas espinales de ratones normales mediante procedimientos bioquímicos clásicos.

La purificación inicial implica la adición de glicerol 4M fmal al sobrenadante (S1) obtenido a partir del homogenado

bruto.

5 Cuando estas mezclas se incuban durante una hora a una temperatura de 4°C, los neurofilamentos forman un gel que se deposita en el segundo sedimento (P2) después de la centrifugación (Leterrier & Eyer, 1987).

10 Cuando la fase de incubación/centrifugación se repite con el sedimento P2, se pueden recuperar otros neurofilamentos en el sedimento P3. Extrañamente, el análisis mediante transferencia Western de las fracciones enriquecidas en neurofilamentos revela la presencia de especies de tubulina al mismo tiempo  $\alpha$  y  $\beta$  tanto como  $\gamma$ . Unos resultados similares se han obtenido cuando los sobrenadantes se incubaban con colchicina (hasta 3 mM), que impide el ensamblaje de microtúbulos, o después de múltiples ciclos de sedimentación y de resuspensión de los depósitos a baja temperatura, una condición que impide asimismo el ensamblaje de microtúbulos (figura 1A).

15 El examen de los neurofilamentos recuperados en las fracciones P3 mediante microscopía electrónica reveló una abundancia de neurofilamentos altamente decorados por material amorfo. Al contrario, los microtúbulos en estas fracciones eran raros y cuando se les encontraba, eran cortos. Típicamente, cuando 10  $\mu$ g de la fracción P3 a una temperatura de 4°C se cargaban en una rejilla de malla de 300, sólo algunos cuadrados de rejilla contenían unos microtúbulos cortos. Sin embargo, cuando estas mismas fracciones se incubaban a una temperatura de 37°C en presencia de 1 mM GTP, para favorecer la polimerización, muchos microtúbulos largos se podían reconocer en cada cuadrado de rejilla (hasta 50) y estos últimos estaban frecuentemente asociados a unos neurofilamentos (figura 1B).

20 Estas observaciones demuestran que la tubulina no polimerizada (aislamiento frío) se asocia a los neurofilamentos. Esta tubulina conserva todo su potencial de polimerizabilidad en condiciones favorables (37°C en presencia de GTP).

25 Con el fin de comparar la cantidad relativa de tubulina que sedimenta en microtúbulos con la unida a los neurofilamentos, tal como se demuestra mediante la sedimentación en la fracción de neurofilamentos, se ha incubado la muestra bruta de cerebro (S1) en presencia de GTP y de glicerol, o bien a 37°C, o bien a 4°C, antes de la centrifugación a la misma temperatura.

30 Después de la incubación a 37°C,  $9,55 \pm 1,14\%$  de las proteínas totales se encuentran en el sedimento mientras que  $90,45 \pm 1,14\%$  permanece en el sobrenadante.

35 Después de la incubación a 4°C,  $4,53 \pm 0,34\%$  está presente en el sedimento mientras que  $95,43 \pm 0,34\%$  permanece en el sobrenadante (n=3).

Se observa por lo tanto que 5% de las proteínas totales contenidas en la muestra bruta (S1) representa la tubulina no polimerizada capaz, con proteínas asociadas, de polimerizar en microtúbulos.

40 Con el fin de evaluar la capacidad de los neurofilamentos para unir la tubulina, se ha incubado una misma cantidad de neurofilamentos con unas cantidades crecientes de tubulina durante una hora a 4°C, y después se ha centrifugado durante 30 minutos a 100.000 g.

45 El análisis mediante transferencia Western de cada sedimento y de los sobrenadantes se ha efectuado después mediante transferencia Western para determinar su contenido en tubulina.

50 La figura 1C muestra que la tubulina presente en el sedimento con los neurofilamentos ha aumentado cuando la tubulina exógena se ha añadido de manera saturable, sugiriendo así una interacción saturable entre las dos parejas. Se señala que, sin neurofilamento, la tubulina presente en el depósito es mucho más baja que la cantidad de tubulina en el depósito sin tubulina exógena añadida.

2 Identificación de las secuencias de unión de la tubulina sobre los neurofilamentos y estudio del efecto de las secuencias *in vitro* (figura 1D, figura 2 y tabla 1)

55 Con el fin de impulsar más el examen de las parejas moleculares de esta interacción, se ha procedido a los experimentos de recubrimiento de transferencia o transferencia overlay (figura 1D).

60 La tercera fracción de una preparación de neurofilamentos (P3), enriquecida en neurofilamentos, se ha separado sobre un gel a 7,5% SDS-PAGE, y después se ha transferido sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se ha incubado con tubulina pura, ha seguido después la tradicional transferencia Western utilizando unos anticuerpos anti- $\beta$ III-tubulina para identificar las proteínas que interactúan con la tubulina (figura 1D línea 1). Este enfoque ha revelado una interacción directa entre la tubulina y las tres subunidades de los neurofilamentos NFL (3), NFM (4) y NFH (5).

65 Cuando no se procede a la adición de tubulina, la tubulina anti- $\beta$ III reconoce sólo un grupo, la tubulina  $\beta$ III que está presente en la fracción P3 (2). Considerando la intensidad de las señales, la interacción de la tubulina es más intensa con NFL y NFM que con NFH.

Además, sólo la isoforma fosforilada de NFH enlaza la tubulina. Dos señales adicionales se han detectado con este método y corresponden a la sinapsina I y II y a las proteínas MAP.

5 Sin embargo, la sinapsina no se ha co-purificado con los neurofilamentos y no se ha co-agregado con los neurofilamentos en los cuerpos celulares de ratones NFHLacZ (datos no comunicados, véase a continuación).

Con el fin de identificar las secuencias responsables de la unión de la tubulina a los neurofilamentos, se utilizan unos chips peptídicos sobre membrana y que corresponden a las tres subunidades de neurofilamentos (véanse los procedimientos experimentales). Este método permite la identificación del dominio enlazador implicado en la interacción proteína-proteína. El experimento de transferencia overlay con tubulina purificada sobre chips peptídicos ha revelado que el sitio que une la tubulina está situado en el dominio N-terminal de las secuencias de neurofilamentos. La subunidad NFL contiene dos secuencias enlazadoras de tubulina de veinticuatro aminoácidos que se denominan NFL-TBS1 y NFL-TBS2, mientras que NFM-TBS y NFH-TBS contienen ambos treinta y nueve aminoácidos (figura 2A).

Se ha demostrado anteriormente en la figura 1 que los neurofilamentos contenían tubulina no polimerizada. Considerando este resultado, la identificación de los sitios que unen la tubulina pueden tener una pertinencia funcional *in vitro* sobre la polimerización de la tubulina, es decir que puede ser capaz de influir la dinámica microtubular. Con el fin de probar esta hipótesis, se han realizado unos experimentos en turbidimetría con las diferentes secuencias de péptido identificadas mediante transferencia overlay sobre chip peptídico. Con este objetivo, el sobrenadante S3 (que contiene tubulina libre) que procede de una preparación de microtúbulo, se ha polimerizado a 37°C en presencia de 1 mM de GTP y de varias concentraciones (3, 10, 30 y 100 µM) de péptido que une la tubulina, y que han sido añadidos antes de la polimerización (t=0). La figura 2C, 1, 2, 3, 4 muestra que cada péptido tiene un efecto de inhibición dosis-dependiente sobre la formación de los microtúbulos. La capacidad de inhibición de los péptidos era aproximadamente de 30% con una concentración de 100 µM, salvo para NFL-TBS2 que inhibe al 100% la polimerización de la tubulina a 100 µM (figura 2B 5). Parece que el proceso implicado en esta inhibición sea específico del mecanismo de polimerización, puesto que estos péptidos no tienen efecto sobre los microtúbulos preformados, a 30 minutos de polimerización (figura 2B 6).

Unos análisis bioinformáticos sobre las secuencias N-terminales de los neurofilamentos muestran que los péptidos ensayados antes están posicionados en una zona altamente conservada de este dominio si se considera el número de aminoácidos conservados entre las tres subunidades de neurofilamentos y entre las especies (BLAST). Esta conservación es específica del dominio N-terminal de los neurofilamentos (tabla 1) y parece perderse o ser menos fuerte cuando se practica una alineación con otros tipos de filamentos intermedios.

Tabla 1: Análisis de la homología entre los sitios implicados en la unión con la tubulina.

		‡	20	‡	40	‡	60	‡	80																													
NFL :	ES	SGE	V	PYPF	HS	SR	RY	Y	TP	RV	HI	ES	VS	EG	Y	TA	SS	YS	Y	VA	D	V	SG	L	V	R	R	Y	GG	---	SG	L	AP	SL	EN	DI	: 72	
NFM :	EG	ET	LA	SG	NP	AA	RR	Y	PT	EL	ES	SR	RY	VS	CG	PE	EC	ES	OS	W	R	CG	ES	V	GS	Y	TR	EA	V	P	RL	AV	ES	AA	LS	ES	SS	: 77
NFH :	ES	GS	AA	AL	LG	AP	AP	EG	GG	GS	LV	LS	KA	GP	CG	ET	ES	AG	SS	CG	RR	VA	RS	V	YS	VA	RP	SR	RR	GA	SS	ET	DS	---	---	: 75		

		‡	20	‡	40	‡	60	‡	80	‡	100																												
NFL	:	ES	SGE	V	PYPF	HS	SR	RY	Y	TP	RV	HI	ES	VS	EG	Y	TA	SS	YS	Y	VA	D	V	SG	L	V	R	R	Y	GG	---	SG	L	AP	SL	EN	DI	: 74	
NFM	:	EG	ET	LA	SG	NP	AA	RR	Y	PT	EL	ES	SR	RY	VS	CG	PE	EC	ES	OS	W	R	CG	ES	V	GS	Y	TR	EA	V	P	RL	AV	ES	AA	LS	ES	SS	: 79
NFH	:	ES	GS	AA	AL	LG	AP	AP	EG	GG	GS	LV	LS	KA	GP	CG	ET	ES	AG	SS	CG	RR	VA	RS	V	YS	VA	RP	SR	RR	GA	SS	ET	DS	---	---	: 78		
Desmina	:	CG	AY	SS	QR	---	YS	SR	Y	TP	RV	HI	ES	VS	EG	Y	TA	SS	YS	Y	VA	D	V	SG	L	V	R	R	Y	GG	---	SG	L	AP	SL	EN	DI	: 91	
Vimentina	:	ET	RS	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	: 87		
Keratina-8	:	ET	RS	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	: 81			
EndoA	:	ET	RS	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	: 81			
Gfap	:	RR	RI	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	: 50			
Peripherina	:	PP	SA	MS	HE	HS	CG	LS	SS	IG	SS	VS	RT	FG	PP	SL	AG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	: 85			
a-internexina	:	EG	FS	GR	RY	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	: 78			

La secuencia de las tres subunidades de los neurofilamentos y de diversos filamentos intermedios han sido alineadas con el programa ClustalW en función de su homología (endoA: citoqueratina endoA; Ker 8; keratina 8; NFL: subunidad ligera de los neurofilamentos; NFM: subunidad media de los neurofilamentos; NFH: subunidad pesada de los neurofilamentos; periph: periferina; internex: α-internexina; gfap: gliofilamento; vim: vimentina).

Numerosos aminoácidos se conservan en la parte N-terminal de las tres subunidades de los neurofilamentos y en menor medida en los dominios N-terminales de los otros filamentos intermedios.



### 3 Análisis morfológico del citoesqueleto microtubular axonal en los ratones transgénicos NFHlacZ (figura 3)

Con el fin de estudiar el significado *in vivo* de la asociación neurofilamento-tubulina demostrado en las investigaciones bioquímicas anteriores, se han estudiado unos ratones transgénicos NFHlacZ en los que la repartición de los neurofilamentos está perturbada.

Bajo la influencia de los elementos reguladores de NFH, el transgén NHlacZ se expresa en la mayoría de las neuronas.

La proteína de fusión codificada por el transgén se ensambla a la red de neurofilamentos y, a través de los dominios de dimerización de la  $\beta$ -galactosidasa, reticula los neurofilamentos ensamblados, y previene su exportación hacia el compartimento axonal. A pesar de la mala repartición del citoesqueleto de los neurofilamentos, estas neuronas son generalmente viables hasta una edad avanzada (Eyer & Peterson, 1994).

Con el fin de determinar si la ausencia de neurofilamentos en los axones de ratones transgénicos NFHlacZ afecta al citoesqueleto microtubular, se han examinado mediante microscopía electrónica (figura 3) unas muestras de nervios ciáticos y de médulas espinales que proceden de ratones mayores. Se ha observado una red característica y densa de neurofilamentos en los cortes de todos los axones de gran calibre que proceden de los nervios ciáticos normales.

En las muestras transgénicas, se podían reconocer pocos, si no ninguno, neurofilamentos, mientras que por el contrario, el citoesqueleto microtubular axonal era particularmente denso.

Con el fin de evaluar la densidad microtubular, se han contabilizado los perfiles de microtúbulo encontrados en el interior de una superficie de corte predeterminado. (De Waegh *et al.*, 1992). Los axones control contenían  $9,44 \pm 1,4$  microtúbulos/ $\mu\text{m}^2$  mientras que en la misma zona axonal en las muestras transgénicas (número de axones = 500), la densidad microtubular era más de 10 veces superior a  $99,06 \pm 5,1$  microtúbulos/ $\mu\text{m}^2$ .

Se ha demostrado anteriormente que el diámetro medio de los axones en los ratones transgénicos NFHlacZ se reducía en 50% (Eyer & Peterson, 1994). Por lo tanto, la densidad microtubular elevada en los axones podría representar la simple consecuencia de la disminución de volumen axonal. Sin embargo, los cambios de volumen solos no son suficientes para explicar la amplitud del aumento de densidad tubular observada, es decir para asumir un perfil circular, un axón normal que tiene un diámetro de  $10 \mu\text{m}$  con una superficie de corte de  $78,5 \mu\text{m}^2$  y con  $9,44 \pm 1,4$  microtúbulos/ $\mu\text{m}^2$  debería contener aproximadamente 741 perfiles microtubulares.

Si el mismo axón fuera deficiente en neurofilamentos, su diámetro se habría reducido a  $5 \mu\text{m}$  y tendría una superficie de corte de  $19,6 \mu\text{m}^2$ . Si el mismo número de microtúbulos estuviera presentes, su densidad sería de  $741/19,6 \mu\text{m}^2$  o  $37,8$  microtúbulos/ $\mu\text{m}^2$ .

Por lo tanto, un aumento de densidad máxima de cuatro veces ( $37,8/9,44 = 4,0$ ) se podría deber a la única reducción del calibre axonal en 50%. En consecuencia, las muestras transgénicas contienen dos veces y media más de microtúbulos que dejaban prever los únicos parámetros del volumen y de la concentración, puesto que la densidad microtubular ha aumentado diez veces.

### 4. Acumulación de ARNm de tubulina, perfil de expresión y repartición de los isotipos (figura 4 y figura 5 y tabla 2)

Tanto el desarrollo como la regeneración axonal están asociados a un programa complejo de expresión de los isotipos de tubulina regulados de manera temporal y espacial, reflejando frecuentemente la densidad de las redes microtubulares. Se ha determinado si los ARNm de tubulina varían en las muestras de los ratones normales o transgénicos de edad creciente. A pesar de una evaluación exhaustiva de la acumulación de los ARNm, no se ha observado ninguna diferencia evidente durante el desarrollo postnatal de los animales.

El análisis mediante transferencia Northern de cerebros control y de las muestras de médulas espinales obtenidos durante el primer mes de crecimiento ex-útero reveló una clara remisión para los ARNm de los dos isotipos de tubulina  $\text{M}\alpha 1$  y  $\text{M}\beta 2$ . A esto le seguía el mantenimiento de un nivel bajo a lo largo de la madurez (figuras 4A, 5A).

El perfil de expresión de los ARNm  $\text{M}\alpha 2$  y  $\text{M}\beta 3$  son similares entre las muestras de cerebro y las de médula espinal, estando ambos presentes a un nivel elevado en el nacimiento y permaneciendo elevados a lo largo de la madurez (figuras 4B y 5B).

Para cada transferencia Northern, las señales han sido normalizadas por la GADPH que no está modificada por la agregación de NF (Robert *et al.*, 2001). La señal obtenida a los dos días sirve de referencia y se fija a 1 salvo para la tubulina  $\beta 5$  2,8 kb(\*), que se compara con la señal de la tubulina 1,8 kb a los 2 días en el cerebro control. (ND: no determinado por causa de la señal demasiado baja).

Se ha detectado un perfil de dos fases para el esquema de expresión de los ARNm de tubulina M $\beta$ 4 en las muestras de cerebro y de médula espinal (figura 5C).

5 La secuencia no traducida 3' de M $\beta$ 5 ha reconocido dos transcritos de 1,8 y 2,8 kb (figura 5D, 5E), que han sufrido a su vez un fuerte declive entre el segundo día postnatal y la madurez a las cuatro semanas.

10 Por último, el perfil de expresión de la tubulina M $\beta$ 6 es bastante similar a lo que se ha observado para la tubulina M $\alpha$ 1 (figuras 5F y 4A). No se ha detectado ninguna indicación de la expresión de isoformas desajustadas en los ratones transgénicos. Para M $\alpha$ 3/7, normalmente expresada en los testículos (Villasante *et al.*, 1986) y M $\beta$ 1, normalmente hematopoyético-específico (Wang *et al.*, 1986), no se ha detectado ninguna señal en las muestras de cerebro y de médula espinal, en ninguna etapa del desarrollo (figura 4C).

15 Para los isotipos de tubulina ensayados en este estudio, no se ha observado ninguna diferencia en los perfiles de expresión de los ARNm entre las muestras transgénicas y control, sugiriendo así que unos cambios en la densidad de microtúbulos axonales se efectúan a nivel post-traducciona

Tabla 2A: La cantidad de ARNm de tubulina no está modificada en los ratones transgénicos.

A	CEREBRO							
	2 días		4 semanas		adultos		18 meses	
	-	+	-	+	-	+	-	+
tubulina $\alpha$ 1	1 $\pm$ 0	0,82 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01
tubulina $\alpha$ 2	1 $\pm$ 0	1,06 $\pm$ 0,3	0,96 $\pm$ 0,18	0,78 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,26	1 $\pm$ 0,17	0,93 $\pm$ 0,07
tubulina $\beta$ 2	1 $\pm$ 0	0,88 $\pm$ 0,9	0,42 $\pm$ 0,0	0,41 $\pm$ 0,16	0,47 $\pm$ 0,18	0,33 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,22	0,5 $\pm$ 0,03
tubulina $\beta$ 3	1 $\pm$ 0	1,09 $\pm$ 0,11	1,08 $\pm$ 0,32	1,1 $\pm$ 0,11	0,89 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,13	0,9 $\pm$ 0,09	0,9 $\pm$ 0,03
tubulina $\beta$ 4	1 $\pm$ 0	1,19 $\pm$ 0,08	2,84 $\pm$ 0,08	3,07 $\pm$ 0,05	1,39 $\pm$ 0,1	1,89 $\pm$ 0,33	1,61 $\pm$ 0,24	1,55 $\pm$ 0,34
tubulina $\beta$ 5 1,8 kb	1 $\pm$ 0	1,47 $\pm$ 0,35						
tubulina $\beta$ 5 2,8 kb	11,35 $\pm$ 2,93*	11,04 $\pm$ 2,34	0,66 $\pm$ 0,11	0,92 $\pm$ 0,31	0,61 $\pm$ 0,21	0,59 $\pm$ 0,48	0,79 $\pm$ 0,54	0,75 $\pm$ 0,54
tubulina $\beta$ 6	1 $\pm$ 0	1,08 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,07	0,13 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,02
	MÉDULA ESPINAL							
tubulina $\alpha$ 1	0,6 $\pm$ 0,24	0,51 $\pm$ 0,19	0,19 $\pm$ 0,09	0,1 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,04	0,1 $\pm$ 0,05	0,6 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,04
tubulina $\alpha$ 2	0,95 $\pm$ 0,31	0,94 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,16	0,83 $\pm$ 0,15	1,15 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,24	0,79 $\pm$ 0,31
tubulina $\beta$ 2	3,15 $\pm$ 0,1	2,19 $\pm$ 0,2	0,55 $\pm$ 0,14	0,4 $\pm$ 0,11	0,31 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,02
tubulina $\beta$ 3	1,1 $\pm$ 0,18	0,93 $\pm$ 0,0	0,95 $\pm$ 0,0	0,89 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,2	0,94 $\pm$ 0,24	0,96 $\pm$ 0,2	1,13 $\pm$ 0,18
tubulina $\beta$ 4	1,33 $\pm$ 0,62	1,2 $\pm$ 0,37	4,73 $\pm$ 0,98	5 $\pm$ 0,04	3,7 $\pm$ 0,44	2,65 $\pm$ 0,04	2,77 $\pm$ 0,07	3,12 $\pm$ 0,25
tubulina $\beta$ 5 1,8 kb	1,08 $\pm$ 0,38	0,77 $\pm$ 0,23						
tubulina $\beta$ 5 2,8 kb	9,64 $\pm$ 4,13	8,3 $\pm$ 6	1,12 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,62	0,35 $\pm$ 0,2	0,87 $\pm$ 0,62	0,85 $\pm$ 0,68	0,42 $\pm$ 0,24
tubulina $\beta$ 6	0,52 $\pm$ 0,1	0,47 $\pm$ 0,08	0,21 $\pm$ 0,08	0,18 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,08

20 5 Análisis de la acumulación de microtúbulos y capacidad de polimerización (figura 6, tablas 2A y 2C)

25 Con el fin de evaluar la cantidad total de tubulina acumulada, se han analizado unos homogenados brutos de cerebros, de médulas espinales y de nervios ciáticos mediante transferencia Western utilizando unos anticuerpos que reconocen la tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ , las isoformas neuronales  $\beta$ III, la forma poliglutamilada GT335 y la tubulina  $\gamma$ . Con el fin de comparar la acumulación relativa de los isotipos, se han preparado todas las muestras sobre el mismo gel y se ha analizado la misma membrana de transferencia de manera secuencial con todos los anticuerpos. En cada caso, los anticuerpos de unión se han detectado utilizando una reacción quimioluminiscente y se ha determinado la cantidad relativa de tubulina entre muestras midiendo las intensidades de las señales sobre la película. Los resultados de los triplicados de experimentos (3 dosificaciones independientes a partir de las muestras preparadas a partir de dos ratones adultos de cada genotipo) han mostrado de manera convincente que las muestras transgénicas y control contienen los mismos niveles de cada isoforma de tubulina buscada (figura 6A, tabla 2B).

Tabla 2B: La cantidad de proteínas de tubulina no está modificada en los ratones transgénicos.

B	+/- ratio (%)		
	CEREBRO	MÉDULA ESPINAL	NERVIO CIÁTICO
$\alpha$ -tub	97 $\pm$ 3	105 $\pm$ 8	97 $\pm$ 5
$\beta$ -tub	103 $\pm$ 30	106 $\pm$ 26	105 $\pm$ 10
$\beta$ III-tub	99 $\pm$ 7	119 $\pm$ 21	91 $\pm$ 9
GT335	104 $\pm$ 2	126 $\pm$ 33	94 $\pm$ 12

35 Las señales obtenidas para los ratones control se han fijado a 100% y los ratios controles/transgénicos se han calculado para cada experimento. No se ha observado ninguna diferencia en la cantidad de tubulina entre los

ratones control y transgénicos.

Con el fin de determinar si el aumento del número de microtúbulos axonales se puede deber a un aumento de la eficacia de la tubulina a polimerizar, se ha estudiado la capacidad relativa de polimerización de la tubulina a partir de cerebros de animales transgénicos o control. Con este objetivo, las proteínas de microtúbulo se han aislado por unos ciclos de polimerización, a 37°C, y de despolimerización a 4°C (Weingarten *et al.*, 1975). En cada ciclo, se extrae una alícuota y se analiza mediante transferencia Western, utilizando el panel completo de los anticuerpos anti-tubulina, descritos anteriormente, y mediante microscopía electrónica. En un primer tiempo, el sobrenadante del extracto bruto (S1) se ha incubado a 37°C y los microtúbulos ensamblados se han recuperado mediante sedimentación (P2). Los microtúbulos ensamblados presentes en el segundo sedimento se han resuspendido y después se han despolimerizado a 4°C antes de ser centrifugados para obtener tubulina libre (S3) y unos "microtúbulos estables al frío" (P3). No se ha observado ninguna diferencia cuantitativa evidente entre las muestras transgénicas y control en cualquier etapa de este procedimiento clásico de purificación de los microtúbulos (figura 6B).

Cuando se ha depositado la misma cantidad de proteínas por pocillo en el gel SDS PAGE, y se ha evaluado el ratio de la señal para la inmuno-reactividad de la tubulina (S2/P2 y S3/P3), se han obtenido los mismos valores entre las muestras transgénicas y control (tabla 2C).

Tabla 2C: Los ratios entre la tubulina polimerizada y no polimerizada tampoco están modificados en los ratones NFHLacZ en el cerebro.

C	CEREBRO			
	S2-/P2-	S2+/P2+	S3-/P3-	S3+/P3+
α-tub	0,68 ± 0,27	0,61 ± 0,20	1,22 ± 0,27	1,29 ± 0,19
β-tub	0,83 ± 0,16	0,79 ± 0,11	1,29 ± 0,27	1,12 ± 0,20
βIII-tub	0,38 ± 0,05	0,39 ± 0,02	1,60 ± 0,68	1,49 ± 0,32

Se han obtenido los mismos ratios S2/P2 a partir de los nervios ciáticos de los ratones transgénicos o control (tabla 2D).

Tabla 2D: Los ratios entre la tubulina polimerizada y no polimerizada no están modificados tampoco en los ratones NFHLacZ en el nervio ciático.

D	NERVIO CIÁTICO	
	S2-/P2 -	S2+/P2+
α-tub	1,38 ± 0,78	1,39 ± 0,65
β-tub	1,33 ± 0,10	1,36 ± 0,47
βiii-tub	1,80 ± 0,58	2,06 ± 0,43

Tablas 2C y D: Análisis mediante transferencia Western de las diferentes fracciones de una preparación de microtúbulos de cerebros (C) o de nervios ciáticos (D) con la ayuda de diferentes anticuerpos dirigidos contra las tubulinas α, β, βIII. Las señales obtenidas se escanean y se han calculado los ratios S2/P2 y S3/P3. No se ha observado ninguna diferencia para estos ratios entre los ratones control (-) y NFHLacZ (+).

Los ratios S3/P3 no han podido ser evaluados a causa de la baja cantidad de proteínas presente en estas muestras.

Con el fin de comparar asimismo las propiedades de polimerización de la tubulina, se han incubado los extractos brutos (S1) de los cerebros transgénicos o control bajo condiciones que permiten la formación de microtúbulos (37°C o en presencia de Taxol (60 μM)). Para evaluar el potencial relativo de despolimerización, se han incubado dichos extractos brutos en unas condiciones que permiten el desensamblaje de los microtúbulos (4°C o con colchicina). Siguiendo dichos tratamientos, se ha centrifugado cada preparación y se han recuperado los microtúbulos en el sedimento y se ha recuperado la tubulina no polimerizada en el sobrenadante. Nuevamente, no se ha observado ninguna diferencia evidente en la intensidad de la señal para los diferentes epítomos de tubulina en estas muestras de ratones transgénicos o control (figura 6C, D).

#### 6. Análisis ultraestructurales e inmunocitoquímicos de los agregados de neurofilamentos (figura 7)

Estudios anteriores sobre los ratones transgénicos NFHLacZ han demostrado que los neurofilamentos están retenidos en agregados densos en el interior del cuerpo celular (Eyer y Peterson, 1994). Con el fin de determinar si dichos agregados de neurofilamentos ejercen asimismo una influencia sobre el ensamblaje de los microtúbulos *in vivo*, se ha examinado en los agregados la presencia de tubulina y de microtúbulos utilizando al mismo tiempo la inmunohistoquímica acoplada a la microscopía confocal y la microscopía electrónica. Aunque los perfiles de microtúbulos sean aparentes en el citoplasma adyacente a los agregados, no se ha detectado ninguno, tanto en el interior como en la periferia de los agregados (los perfiles completos de 50 agregados han sido examinados a

50.000X) (figura 7A). En contraste, en las preparaciones inmunocitoquímicas evaluadas mediante microscopía confocal, los epítomos de tubulina han sido claramente detectados en el interior de los agregados (figura 7B). Mientras que los agregados pericariales han sido fuertemente marcados con unos anticuerpos anti-neurofilamento y anti-periferina, se ha observado el marcado más intenso para los epítomos de tubulina, no en el interior de los agregados, sino en la periferia nuclear y cerca de la membrana citoplásmica. Así, mientras que la tubulina es claramente detectable en el interior de los agregados, puede estar presente en mayor concentración en otros compartimentos sub-celulares. En contraste con la distribución heterogénea de los epítomos de tubulina observada en el interior de las neuronas NFHLacZ, se ha observado un marcado homogéneo pericarial en unas neuronas normales, solapando las señales derivadas de los anticuerpos monoclonales anti- $\beta$ III-tubulina y de los anticuerpos policlonales anti-NFH o anti-periferina (figura 7B). Se han observado asimismo unas distribuciones similares en unas neuronas transgénicas y normales para la tubulina  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$  (no mostrado).

### Ejemplo 2. Los péptidos NFL-TBS2 bloquean la división celular

Los péptidos TBS modifican el ensamblaje *in situ* de los microtúbulos, la mitosis y la proliferación de células.

Los péptidos de NFL-TBS2 demuestran un efecto potente sobre la polimerización *in vitro* de la tubulina. Para determinar si podrían modificar asimismo el ensamblaje *in situ* de los microtúbulos, se han incubado unas células de T98G con 10  $\mu$ m de péptidos SEC ID nº 6 biotinilados. Después de una incubación de 6 horas, más de 75% de las células contienen el péptido (figura 8A, A', A'') y están caracterizadas por una forma esférica poco común. Las células con una señal que mide la presencia de los péptidos baja o ausente han mantenido un citoesqueleto normal de microtúbulo, pero las que contienen el péptido SEC ID nº 6 han mostrado una red desunida de microtúbulos con la tubulina y los péptidos agregados en una masa amorfa.

Los microtúbulos constituyen un componente importante del huso acromático. Para determinar si la presencia de los péptidos SEC ID nº 6 podría afectar a la división de las células, los inventores tienen como costumbre efectuar un análisis FACS (del inglés Fluorescence Activated Cell Sorter) para comparar la repartición de los ciclos de células control y de las células T98G tratadas con 10  $\mu$ m de péptido SEC ID nº 6.

Después de un cultivo de 48 horas, 39% de las células en los cultivos no tratadas con el péptido SEC ID nº 6 estaban en fase G1 de mitosis. Por el contrario, 61% de las células en los cultivos que contienen el péptido SEC ID nº 6 estaban en fase G1 de mitosis, sugiriendo así la parada de la mitosis (figura 8B, B').

El efecto de la exposición del péptido SEC ID nº 6 sobre la proliferación de las células se ha confirmado utilizando un análisis MTS (descrito en Cory A.H. *et al.*, Cancer Commun. 3, 207-212, incorporado en la presente memoria a modo de referencia) en el que los inventores han observado menos células en los cultivos tratados por el péptido SEC ID nº 6 (figura 8C). En otros experimentos, se han sustituido unos medios que contienen el péptido SEC ID nº 6 a las 24 horas (para eventualmente paliar la degradación del péptido durante la incubación), y se ha observado asimismo claramente la inhibición del aumento del número de células en las etapas siguientes al cultivo (datos no mostrados).

Así, después de este tiempo de cultivo, estos resultados sugieren que el péptido SEC ID nº 6 está poco (o nada) degradado o eliminado.

Se observan unos resultados parecidos utilizando otras estirpes de células, por ejemplo MCF7, LS 187, Cos o células de NGP.

### Ejemplo 3. Unos péptidos de otros filamentos intermedios se unen a la tubulina, alteran la polimerización de los microtúbulos y bloquean la división celular.

#### Unión de péptidos procedentes de otros filamentos intermedios a la tubulina

Con el fin de ensayar directamente si otros filamentos intermedios pueden unir la tubulina, se han preparado y evaluado unos chips peptídicos que corresponden a las secuencias de la desmina, de la vimentina, de la citoqueratina y de GFAP tal como se describe en la parte Material y Método (chip peptídico sobre membrana y péptidos sintéticos) del ejemplo 1. Cada uno de sus filamentos intermedios tiene varios sitios de unión a la tubulina:

- se han identificado 3 péptidos para la proteína desmina (figura 9A): Des-TBS 1 (SEC ID nº: 17), Des-TBS2 (SEC ID nº: 18), y Des-TBS3 (SEC ID nº: 19).
- se han identificado 3 péptidos para la proteína vimentina (figura 9B): Vim-TBS 1 (SEC ID nº: 20), Vim-TBS2 (SEC ID nº: 21), y Vim-TBS3 (SEC ID nº: 22)
- se han identificado 3 péptidos para la proteína citoqueratina (figura 9C): Ker-TBS 1 (SEC ID nº: 23), Ker-TBS2 (SEC ID nº: 24), y Ker-TBS3 (SEC ID nº: 25)

- se han identificado 3 péptidos para la proteína GFAP (figura 9D): GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26), GFAP-TBS2 (SEC ID nº: 27), y GFAP-TBS3 (SEC ID nº: 28).

Efecto de los péptidos procedentes de otros filamentos intermedios sobre la polimerización de los microtúbulos

Como anteriormente para los péptidos NF-TBS, se han realizado unos estudios de la influencia de los péptidos de la vimentina, de la citoqueratina y de GFAP identificados mediante chip peptídico sobre el ensamblaje de los microtúbulos *in vitro* mediante la misma técnica que descrita anteriormente en el apartado Material y Método (Análisis mediante espectrofotometría de la polimerización de los microtúbulos) del Ejemplo 1.

Los resultados obtenidos para los péptidos Vim-TBS3 (SEC ID nº: 22), GFAP-TBS3 (SEC ID nº: 28), Ker-TBS1 (SEC ID nº: 23), Vim-TBS2 (SEC ID nº: 21) y GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26) están representados en las figuras 10A a 10E.

Los resultados muestran que los péptidos Vim-TBS3 (SEC ID nº: 22) y GFAP-TBS3 (SEC ID nº: 28), así como el péptido NFL-TBS2 (SEC ID nº: 6), son unos inhibidores de la polimerización de los microtúbulos (figura 10A y B).

Por el contrario, los péptidos Ker-TBS1 (SEC ID nº: 23), Vim-TBS2 (SEC ID nº: 21) y GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26) activan la polimerización de los microtúbulos (Figura 10C, D y E).

Efecto del péptido GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26) sobre la división celular

Con el fin de determinar el impacto de un péptido activador de la polimerización de los microtúbulos sobre la división celular, se ha realizado un análisis FACS para comparar la repartición de los ciclos de células T98G no tratadas (sin péptido) o tratadas con 100 µm de péptido GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26), mediante el mismo protocolo que el descrito en el Ejemplo 2.

Tal como en el Ejemplo 2 con el péptido NFL-TBS2 (SEC ID nº: 6), se observa en presencia del péptido GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26) una disminución del número de células en fase G2 y un aumento del número de células en fase G1 o sub-G1, lo cual indica que la presencia del péptido GFAP-TBS1 (SEC ID nº: 26) inhibe la división celular.

Así, estos resultados sugieren en gran medida que los péptidos procedentes de filamentos intermedios que se unen a la tubulina son capaces de alterar la polimerización de los microtúbulos (inhibición o activación) y por ello, por uno u otro mecanismo, bloquean la división celular.

En conclusión, las relaciones definidas en la presente memoria entre unos fragmentos de filamentos intermedios y la tubulina pueden ejemplificar un mecanismo ampliamente explotado de regulación de los microtúbulos.

Los motivos que corresponden a NF-TBS se han estudiado particularmente en la presente memoria y varios de estos últimos se mutan en diversas enfermedades humanas tal como la esclerosis lateral amiotrófica, o enfermedades de la piel, y cuyas diferentes mutaciones están listadas en la página [www.interfil.org](http://www.interfil.org). Además, varios de dichos residuos de unión TBS están sujetos a la fosforilación dependiente de los ciclos de las células, lo cual sugiere su posible implicación en los equilibrios unión/liberación de la tubulina (Chou *et al.* 1996, Goto *et al.* 1998, Ku *et al.* 1998, Toivola *et al.* 2002, Chou *et al.* 2003).

Los resultados muestran asimismo que unos fragmentos de otros filamentos intermedios (desmina, vimentina, citoqueratina y GFAP) poseen asimismo unos fragmentos capaces de unirse a la tubulina, de alterar la polimerización de los microtúbulos (inhibición o activación) y de bloquear la división celular, demostrando así la existencia de un mecanismo común e importante del control de la división celular mediante alteración de la polimerización de los microtúbulos.

**Referencias**

Carden, M.J., Trojanowski, J.Q., Schlaepfer, W.W., y Lee, V.M.Y. (1987). Two stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J. Neurosci.* 7, 3489-3504.

Cassimeris, L. (2002). The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 18-24.

Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Chou, Y.H., Opal, P., Quinlan, R.A., y Goldman, R.D. (1996). The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells. *J. Cell Sci.* 109, 817-826.

- Chou. Y.H., Khuon, S., Herrmann, H., y Goldman, R.D. (2003). Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassemble of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol. Biol. Cell.*14, 1468-1478.
- 5 Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture., *Cancer Commun.* 3, 207-212.
- De Waegh., S.M., Lee, V.M., y Brady, S.T. (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68, 451-463.
- 10 Eyer, J., y Letierrier, J.F. (1988). Influence of the phosphorylation state of neurofilament proteins on the *in vitro* interactions between purified filaments. *Biochem. J.* 252, 655-660.
- Eyer, J., y Peterson, A.C. (1994). Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 12, 389-405.
- 15 Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., el Sabrouty, S., Dani, C., Jeanteur, P., y Blanchard, J.M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* 13, 1431-1442.
- 20 Frank, R. (1992) Spot-Synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48, 9217-9232.
- Frank, R. y Overwin, H. (1996) SPOT-Synthesis: Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66: Epitope Mapping Protocols (G. E. Morris, Ed.), The Humana Press Inc., Totowa, USA, 149-169.
- 25 Goto, H., Kosako, H., Tanabe, K., Yanagida; M., Sakurai, M., Amano, M., Kaibuchi, K., Inagaki, M. (1998) Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 273,11728-11736.
- 30 Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirolet, F., Lafanechere, L., y Job, D. (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.* 142, 167-179.
- 35 Hirokawa, N. (1982). Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J. Cell Biol.* 94, 129-142.
- Hisanaga, S. y Hirokawa, N. (1990). Dephosphorylation-induced interactions of neurofilaments with microtubules. *J. Biol. Chem.* 265, 21852-21858.
- 40 Hoffman, P.N., y Cleveland, D.W., (1988). Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 85, 4530-4533.
- 45 Hoffman, P.N., Cleveland, D.W., Griffin, J.W., Landes, P.W., Cowan, N.J., y Price, D.L. (1987). Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc. Natl. Acad. Sci.-USA.* 84, 3472-3476.
- Julien, J.P., y Mushynski, W.E. (1982) Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides. *J. Biol. Chem.* 257, 10467-10470.
- 50 Ku, N.O., Liao, J., y Omary, M.B. (1998) Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 17, 1892-1906.
- 55 Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, V.M.Y., Carden, M.J., Schlaepfer, W.W., Trojanowski, J.Q., Otvos, L., Hollosi, M., Dietzchold, B., Lazzarini, R.A. (1988). Identification of the major multiphosphorylation sites in mammalian neurofilaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.-USA* 85, 1998-2002.
- 60 Mandelkow, E., y Mandelkow, E.M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol* 7, 72-81.
- 65 Ohara, O., Gahara, Y., Miyake, T., Teraoka, H., y Kitamura, T. (1993). Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *J. Cell Biol.*121, 387-395.

Robert, P., Peterson, A., y Eyer, J. (2001). Neurofilament cytoskeleton does not modify accumulation of trophic factors mRNA. *J. Neurosci. Res.* 64, 487-492.

5 Toivola, D.M., Zhou, Q., English, L.S., y Omary, M.B. (2002) Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 1857-1870.

Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo S.-Y., y Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 1858-1862.

10 Zhu, Q., Couillard-Despres, S., y Julien, J.P. (1997). Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp. Neurol.* 148, 299-316.

15 Zhu, Q., Lindenbaum, M., Levavasseur, F., Jacomy, H., y Julien, J.P. (1998). Disruption of the NFH gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta, beta'-iminodipropionitrile. *J. Cell Biol.* 143, 183-193.

**Listado de secuencias**

20 <110> INSERM (Institut National de la Santé y de la Recherche Médicale) Universidad de Angers McGill University

<120> Péptido capaz de alterar la polimerización de la tubulina y su utilización para inhibir la proliferación celular

<130> D22155

25 <150> FR 04/04 742

<151> 04-05-2004

<160> 40

30 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 72

<212> ADN

35 <213> *mus musculus*

<400> 1

```
ttcggctacg atccgtactt ttcgacctcc tacaagcggc gctatgtgga gacgccccgg 60
gtgcacatct cc 72
```

40 <210> 2

<211> 72

<212> ADN

<213> *mus musculus*

45 <400> 2

```
actccgcgcc ggtctctccc tcgctgtccg tgcgccgcag ctactcgtcc agctctggct 60
ctttgatgcc ca 72
```

50 <210> 3

<211> 117

<212> ADN

<213> *mus musculus*

<400> 3

```
gcctaccggc gcgttccaac cgagaaccgg tccagcttca gccgcgtgag cggttccccg 60
tccagcggct tccgctcgca gtctgtgtcc cgcggctcgc ccagcaccgt gtctcc 117
```

<210> 4

<211> 117

<212> ADN

60 <213> *mus musculus*

<400> 4

ES 2 375 632 T3

cgctccgagg cgggtcctc cagcggcttc cactcgtggg cgcggacgtc cgtgagctcc 60  
 gtgtccgcct caccagccg ctcccgggc gccgcctcga gcaccgactc gctagac 117

5 <210> 5  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> *mus musculus*

<400> 5  
 Phe Gly Tyr Asp Pro Tyr Phe Ser Thr Ser Tyr Lys Arg Arg Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Pro Arg Val His Ile Ser  
 20

10 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> *mus musculus*

15 <400> 6  
 Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Pro Val Ser Ser Ser Leu Ser Val Arg Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Ser  
 20

20 <210> 7  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> *mus musculus*

<400> 7  
 Ala Tyr Arg Arg Val Pro Thr Glu Thr Arg Ser Ser Phe Ser Arg Val  
 1 5 10 15  
 Ser Gly Ser Pro Ser Ser Gly Phe Arg Ser Gln Ser Trp Ser Arg Gly  
 20 25 30  
 Ser Pro Ser Thr Val Ser Ser  
 35

25 <210> 8  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> *mus musculus*

30 <400> 8  
 Arg Ser Ala Ala Gly Ser Ser Ser Gly Phe His Ser Trp Ala Arg Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Val Ser Ser Val Ser Ala Ser Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ala Ala  
 20 25 30  
 Ser Ser Thr Asp Ser Leu Asp  
 35

35 <210> 9  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> *mus musculus*

<400> 9



ES 2 375 632 T3

Lys Ser Tyr Lys Met Ser Thr Ser Cys Pro Arg Ala Phe Ser Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Phe Thr Ser Cys Pro Cys Ala Arg Ile Ser Ser Ser Ser Pro Ser  
20 25 30

Arg Val Cys Ser Ser Ser  
35

<210> 10

<211> 38

5 <212> PRT

<213> *mus musculus*

<400> 10

Lys Ser Tyr Lys Met Ser Thr Ser Cys Pro Arg Ala Phe Ser Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Phe Thr Ser Cys Pro Cys Ala Arg Ile Ser Ser Ser Ser Pro Ser  
20 25 30

Arg Val Cys Ser Ser Ser  
35

10

<210> 11

<211> 38

<212> PRT

<213> *mus musculus*

15

<400> 11

Arg Phe Ser Ser Ser Arg Leu Leu Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Ala Arg Leu Gly Ser Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gly Ala Leu Arg Leu  
20 25 30

Pro Ser Glu Arg Leu Asp  
35

20

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

<213> *mus musculus*

<400> 12

Met Ser Phe Gly Ser Glu His Tyr Leu Cys Ser Ala Ser Ser Tyr Arg

1 5 10 15

Lys Val Phe Gly Asp Ser Ser Arg Leu Ser Ala  
20 25

25

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

30 <213> *mus musculus*

<400> 13

ES 2 375 632 T3

Arg Gln Leu Gly Thr Met Pro Arg Phe Ser Leu Ser Arg Met Thr Pro  
 1 5 10 15

Pro Leu Pro Ala Arg Val Asp  
 20

<210> 14  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> *mus musculus*

<400> 14

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

Tyr Val Thr Arg Ser Ser Ala Val Arg Leu Arg Ser Ser Val Pro Gly  
 20 25 30

Val Arg Leu Leu Gln Asp Ser Val Asp  
 35 40

10  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Cebador

<400> 15

20  
 ctgcaaggcg attaagttgg 20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 16

gttgtgtgga attgtgagcg 20

35  
 <210> 17  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 17

Met Ser Gln Ala Tyr Ser Ser Ser Gln Arg Val Ser Ser Tyr Arg Arg  
 1 5 10 15

Thr Phe Gly Gly Ala Pro Gly Phe Ser Leu Gly  
 20 25

<210> 18  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 18

ES 2 375 632 T3

Ser Ser Pro Val Phe Pro Arg Ala Gly Phe Gly Thr Lys Gly Ser Ser  
 1 5 10 15

Ser Ser Met Thr Ser Arg Val Tyr Gln Val Ser Arg Thr Ser Gly Gly  
 20 25 30

Ala Gly Gly Leu Gly Ser Leu Arg Ser Ser Arg Leu Gly Thr Thr Arg  
 35 40 45

Ala Pro Ser Tyr Gly Ala  
 50

<210> 19

<211> 21

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 19

Gly Ser Glu Val His Thr Lys Lys Thr Val Met Ile Lys Thr Ile Glu  
 1 5 10 15

Thr Arg Asp Gly Glu  
 20

10

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 20

Met Ser Thr Arg Ser Val Ser Ser Ser Ser Tyr Arg Arg Met Phe Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser

<210> 21

20 <211> 24

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 21

Gly Gly Ala Tyr Val Thr Arg Ser Ser Ala Val Arg Leu Arg Ser Ser  
 1 5 10 15

Val Pro Gly Val Arg Leu Leu Gln  
 20

25

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

30 <213> *Mus musculus*

<400> 22

Ser Leu Pro Leu Val Asp Thr His Ser Lys Arg Thr Leu Leu Ile Lys  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Thr Arg  
 20

35

<210> 23

<211> 54

ES 2 375 632 T3

<212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 23

Met Ser Ile Arg Val Thr Gln Lys Ser Tyr Lys Met Ser Thr Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Ala Phe Ser Ser Arg Ser Phe Thr Ser Gly Pro Gly Ala Arg  
 20 25 30  
 Ile Ser Ser Ser Ser Phe Ser Arg Val Gly Ser Ser Ser Ser Ser Phe  
 35 40 45

Arg Gly Ser Met Gly Thr  
 50

5

<210> 24  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 24

Gln Ile Lys Ser Leu Asn Asn Lys Phe Ala Ser Phe Ile Asp Lys Val  
 1 5 10 15  
 Arg Phe Leu Glu Gln  
 20

15

<210> 25  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 25

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

25

<210> 26  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 26

Met Glu Arg Arg Arg Ile Thr Ser Ala Arg Arg Ser Tyr Ala Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Val Val Arg Gly Leu Gly Pro  
 20

30

<210> 27  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

35

<400> 27

ES 2 375 632 T3

Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Arg Gln Leu Gly Thr Met Pro Arg Phe  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Arg Met Thr Pro Pro Leu Pro Ala Arg Val Asp Phe Ser  
 20 25 30  
 Leu Ala Gly Ala  
 35

5 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 28  
 Lys Ser Val Ser Glu Gly His Leu Lys Arg Asn Ile Val Val Lys Thr  
 1 5 10 15

10 Val Glu Met Arg Asp  
 20

<210> 29  
 <211> 81  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 29  
 atgagccagg cctactcgtc cagccagcgc gtgtcctcct accgcccac cttcggcggc 60  
 gccccgggct tctctctggg c 81

20 <210> 30  
 <211> 166  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 30  
 gagctctccc gtgttccctc gagcaggctt cggtagcaag ggctcctcga gttcaatgac 60  
 atcccgcgtg taccaggtgt cgcgcacgtc gggcggggct ggaggcttgg ggtcgtgctg 120  
 gtctagccgg ctggggacca cccgagcgcc atcctatggc gcgggc 166

30 <210>31  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 31  
 ttctgaagtc catacctaaa agacagtgat gatcaagacc attgagacc gggatggaga 60  
 g 61

35 <210> 32  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 32  
 atgtctacca ggtctgtgct ctcgtcctcc taccgagga tgttcggtgg ctcc 54

45 <210> 33  
 <211> 73  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 33

ES 2 375 632 T3

cggtggcgcc tatgtgaccc ggtcctcggc agtgcgctg cggagcagcg tgccggggct 60  
 gcggctgctt caa 73

<210> 34  
 <211> 60  
 5 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 34  
 10 cttcctctgg ttgacacca ctcaaaaaga acactcctga ttaagacggt tgagaccaga 60

<210> 35  
 <211> 161  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 35  
 tgtccatcag ggtgactcag aaatcctaca agatgtccac ctccgggcc cgggccttca 60  
 gcagccgctc gttcacgagt ggacccggcg cccgcacatcag ctcttcacgc ttttcccggg 120  
 tgggcagcag cagcagcagc ttccggggaa gcatggggcac c 161

<210> 36  
 20 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 36  
 25 gattaaatcc ctgaacaaca agttcgcctc cttcattgac aaggtagcgt tcctggagca 60  
 g 61

<210> 37  
 <211> 88  
 <212> ADN  
 30 <213> *Mus musculus*

<400> 37  
 tgccggggga tccaacactt tcagccgcac caccaaggct gtggttgtga agaagattga 60  
 aaccgagat gggaagctgg tgtccgag 88

<210> 38  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 38  
 atgcctccga gacggtggtc aggggcctct ggtcctagtc gacaactggg taccatgcca 60  
 cgtttctct tg 72

<210> 39  
 <211> 106  
 <212> ADN  
 45 <213> *Mus musculus*

<400> 39  
 gccacgtttc tccttgtctc gaatgactcc tccactcct gccagggctg acttctccct 60  
 ggccggggcg ctcaatgctg gcttcaagga gacacggggc agcgag 106

50 <210> 40  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

55

# ES 2 375 632 T3

<400> 40

ggtaaagact gtggagatgc gggatggtga ggtcattaag gactcgaagc aggagcacia  
g

60  
61

## REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado, caracterizado porque consiste en un péptido que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7 SEC ID nº 8, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 24, SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27 o SEC ID nº 28 o uno de sus fragmentos biológicos artificial de por lo menos 5 aminoácidos, capaz de alterar la polimerización de la tubulina.
2. Péptido según la reivindicación 1, de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 24, SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27 o SEC ID nº 28.
3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque se obtiene por vía recombinante o por síntesis química.
4. Ácido nucleico aislado que codifica para un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Ácido nucleico según la reivindicación 4, que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 29, SEC ID nº 30, SEC ID nº 31, SEC ID nº 32, SEC ID nº 33, SEC ID nº 34, SEC ID nº 35, SEC ID nº 36, SEC ID nº 37, SEC ID nº 38, SEC ID nº 39 o SEC ID nº 40.
6. Vector, caracterizado porque comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5.
7. Célula hospedante, caracterizada porque es transformada por un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, o un vector según la reivindicación 6.
8. Procedimiento de producción de péptido recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- cultivar una célula según la reivindicación 7, en un medio de cultivo y condiciones de cultivo apropiados,
  - recuperar dicho péptido a partir de las células o del medio de cultivo obtenido en la etapa a).
9. Composición farmacéutica que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y/o obtenido mediante un procedimiento según la reivindicación 8, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y/o obtenido mediante un procedimiento según la reivindicación 8, para su utilización para inhibir la proliferación celular y/o la movilidad celular, con el fin de prevenir o tratar una enfermedad seleccionada de entre los cánceres, las infecciones bacterianas, las enfermedades que implican una proliferación de ciertas plantas como las algas o los líquenes, o la soriasis.
11. Péptido según la reivindicación 10, para su utilización para inhibir la angiogénesis durante el crecimiento tumoral.
12. Péptido según la reivindicación 10, para su utilización para inhibir la multiplicación bacteriana.
13. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y/o obtenido mediante un procedimiento según la reivindicación 8 para su utilización *in vitro* como marcador de la tubulina.
14. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y/o obtenido mediante un procedimiento según la reivindicación 8, para su utilización como medicamento.
15. Péptido según la reivindicación 14, caracterizado porque el medicamento está destinado a prevenir o tratar enfermedades que implican una proliferación celular y/o una motilidad celular, a saber las infecciones bacterianas, las enfermedades que implican una proliferación de ciertas plantas como las algas o los líquenes, o la soriasis.
16. Péptido según la reivindicación 14, caracterizado porque el medicamento está destinado a prevenir o tratar unos cánceres.
17. Péptido según la reivindicación 16, caracterizado porque el cáncer es un cáncer del sistema nervioso.
18. Utilización de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y/o obtenido mediante un procedimiento según la reivindicación 8, para la demostración y/o para ensayar *in vitro* unos productos susceptibles de bloquear la interacción entre la tubulina y dicho péptido.
19. Utilización de un fragmento de filamento intermedio capaz de alterar la polimerización de la tubulina



5 seleccionado de entre la citoqueratina endoA que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 10, la periferina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 11, la internexina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 12, la GFAP que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 14, para la preparación de un medicamento destinado a prevenir o tratar unas enfermedades que implican la proliferación celular y/o la movilidad celular, seleccionadas de entre los cánceres, las infecciones bacterianas, las enfermedades que implican una proliferación de ciertas plantas como las algas o los líquenes, o la soriasis.

15 20. Utilización *in vitro* de un fragmento de filamento intermedio capaz de alterar la polimerización de la tubulina seleccionado de entre la citoqueratina endoA que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 10, la periferina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 11, la internexina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 12, la GFAP que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 14 como marcador de la tubulina.

25 21. Fragmento de filamento intermedio capaz de alterar la polimerización de la tubulina seleccionado de entre la citoqueratina endoA que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 10, la periferina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 11, la internexina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 12, la GFAP que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 14 para su utilización como medicamento.

40 22. Utilización de un fragmento de filamento intermedio capaz de alterar la polimerización de la tubulina seleccionado de entre la citoqueratina endoA que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9, la queratina 8 que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 10, la periferina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 11, la internexina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 12, la GFAP que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 13 o la vimentina que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 98% y 100% de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 14 para la demostración y/o para ensayar *in vitro* unos productos susceptibles de bloquear la interacción entre la tubulina y dicho fragmento de filamento intermedio.

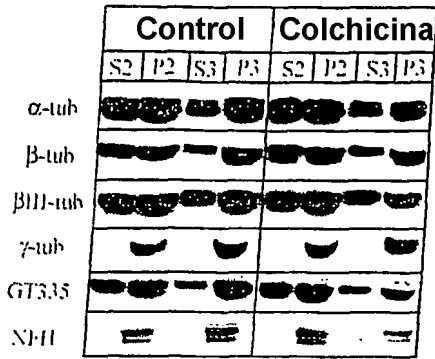


Figura 1A

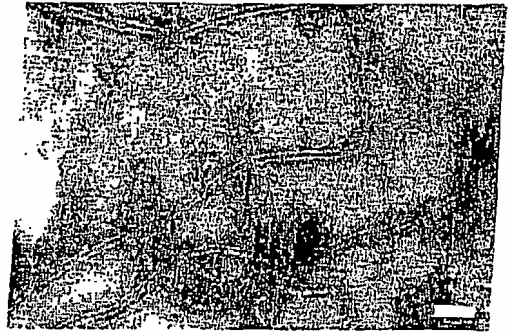


Figura 1B

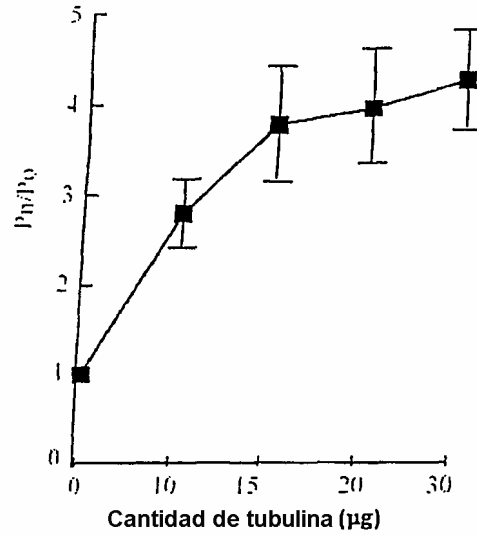
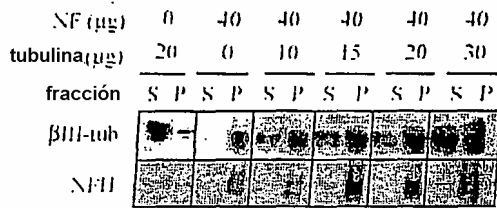


Figura 1C

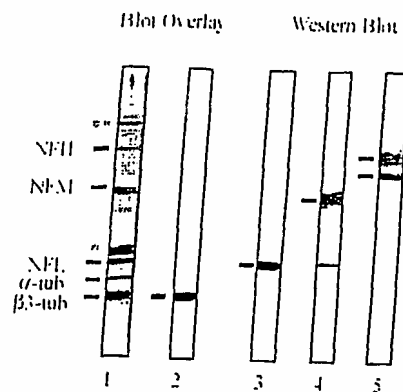


Figura 1D

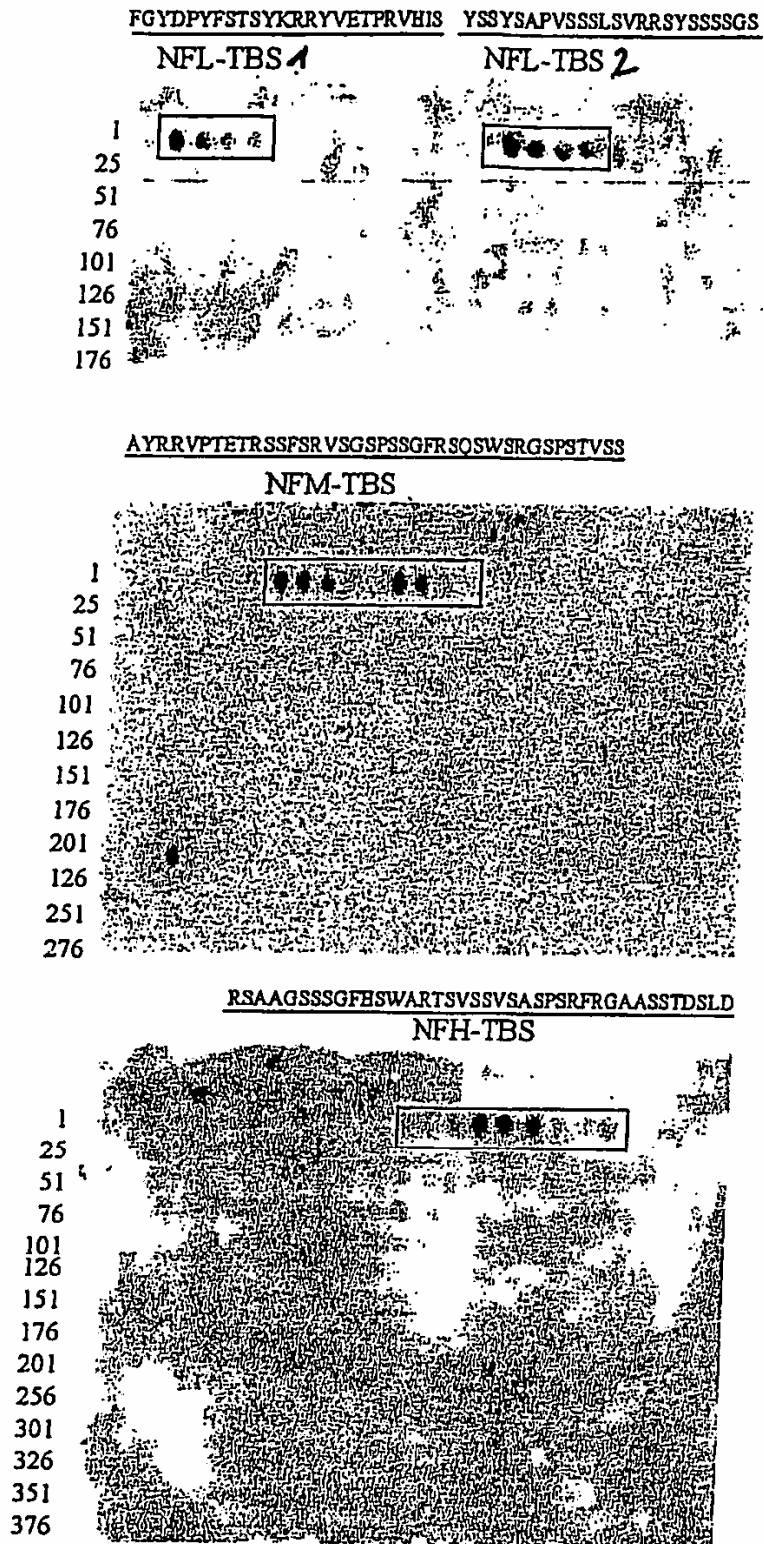


Figura 2A

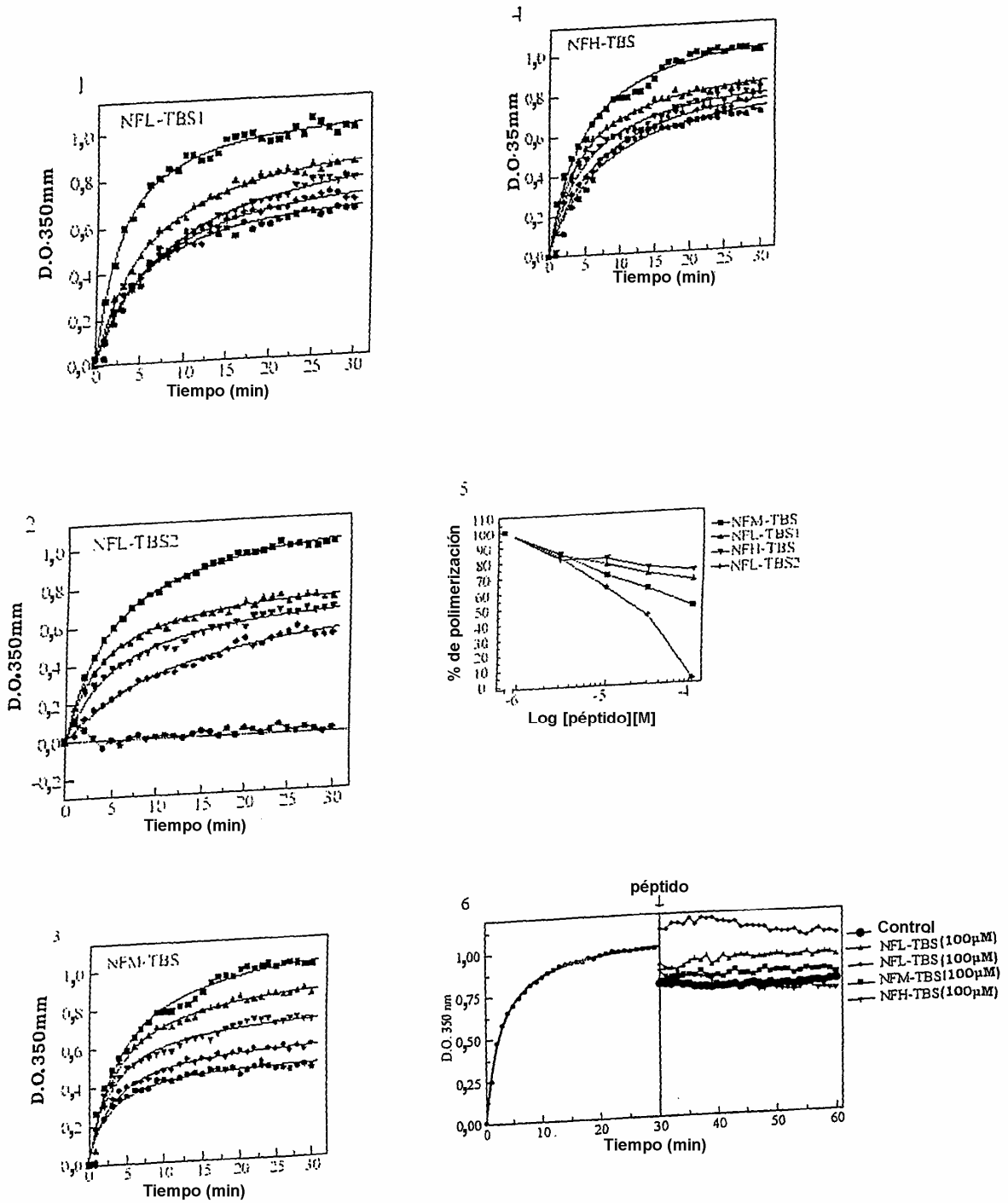
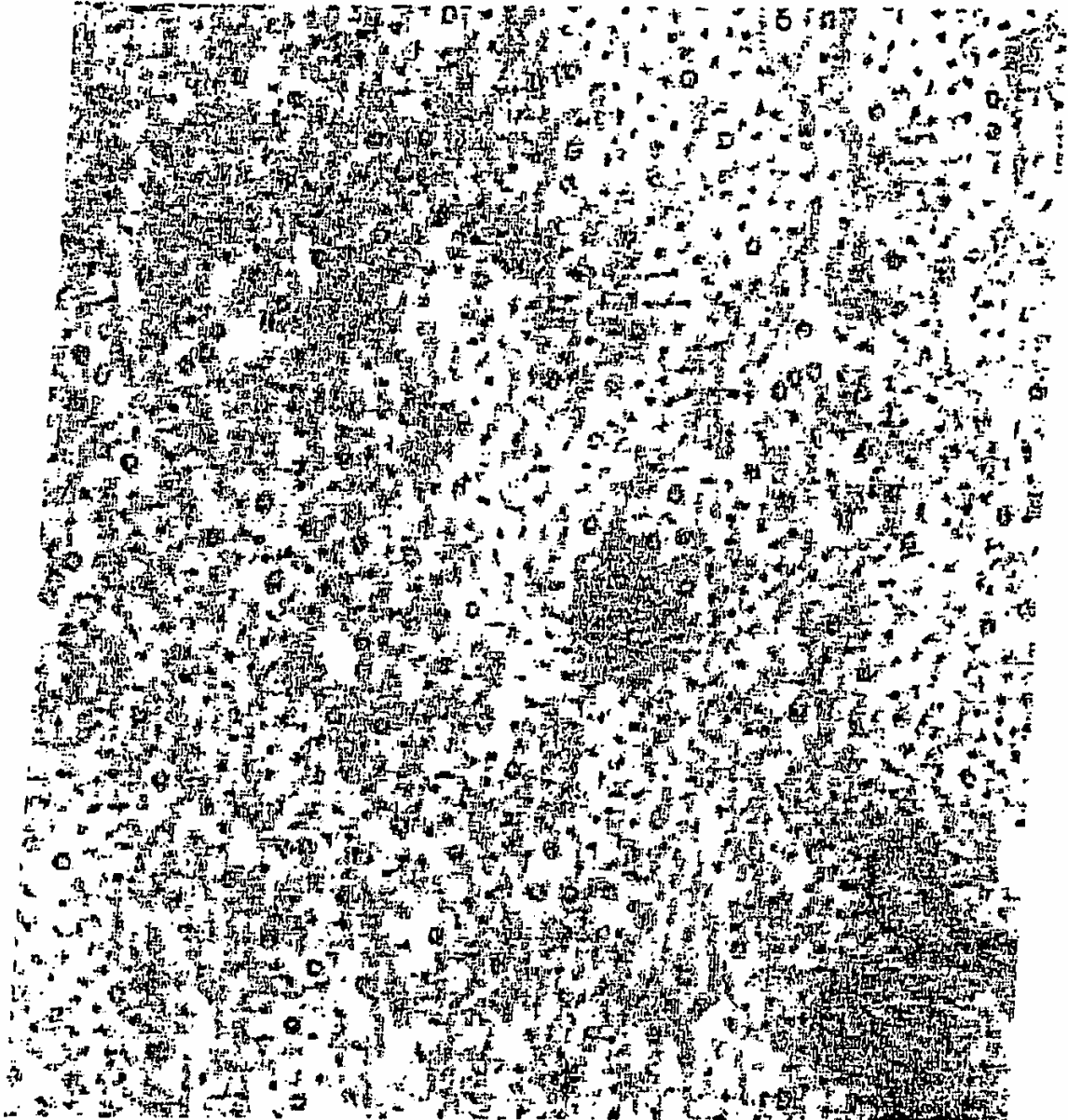


Figura 2B

# Control



**Figura 3A**

# Transgénico

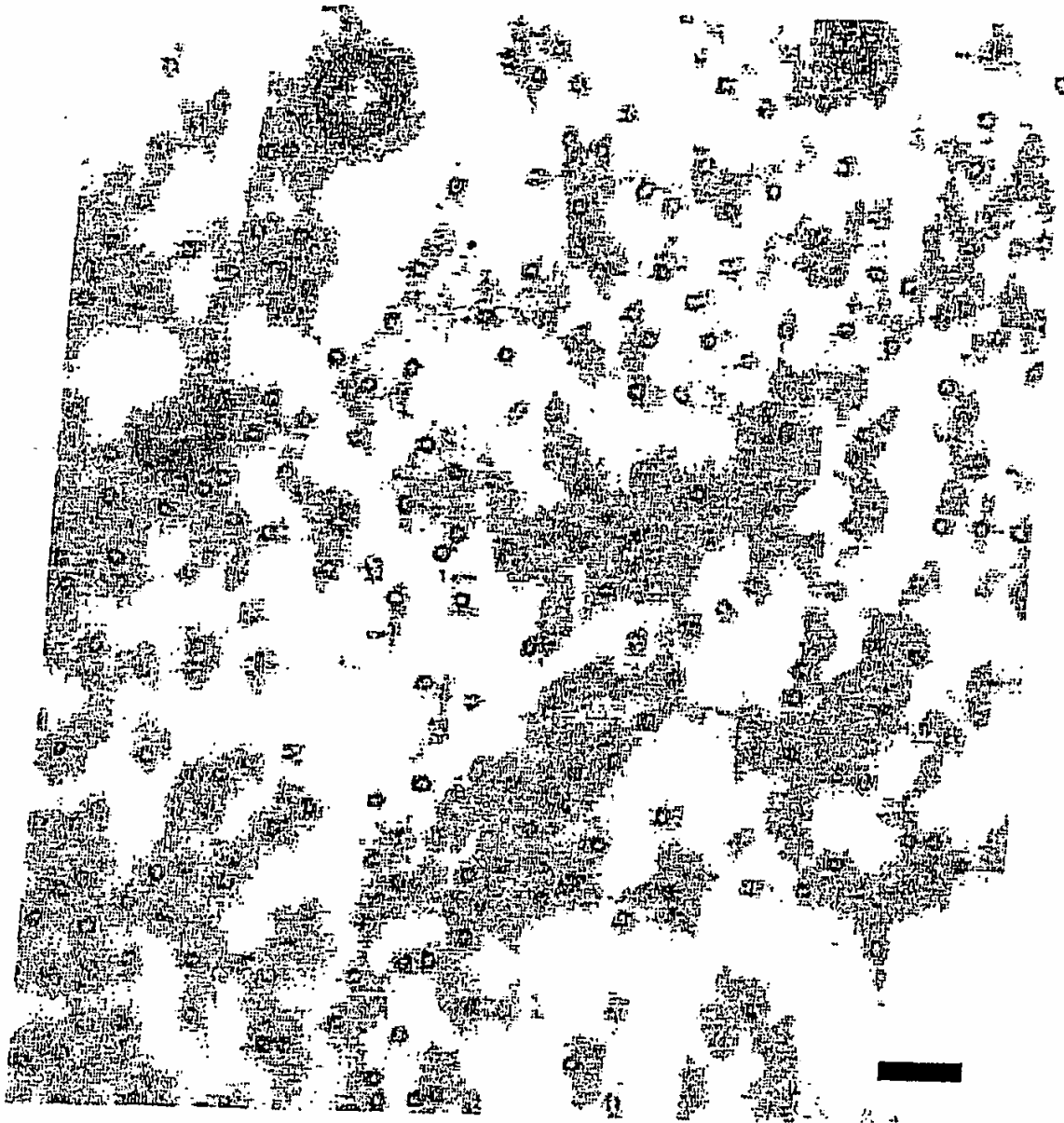
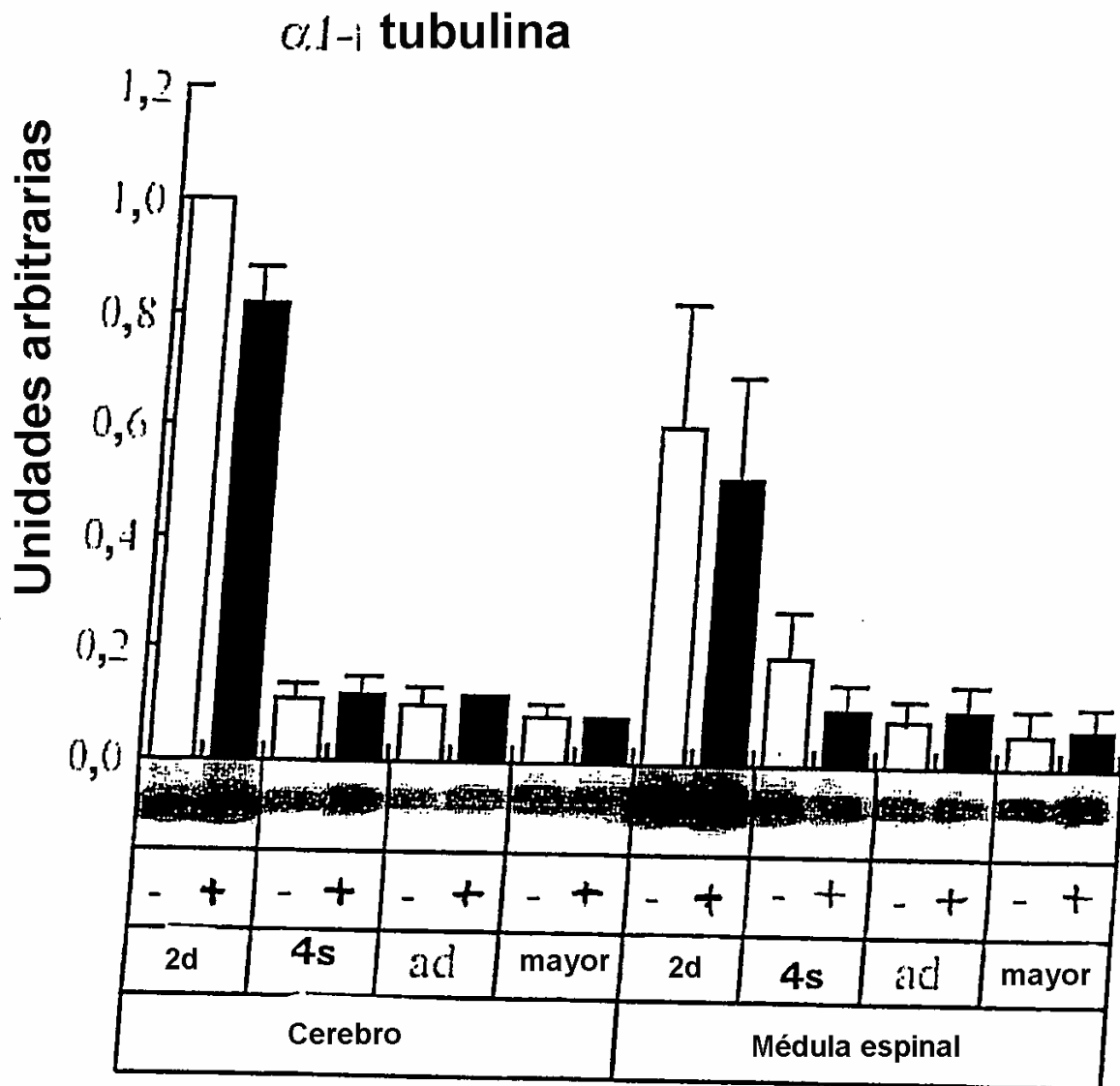


Figura 3B



**Figura 4A**

$\alpha 2$ - Tubulina

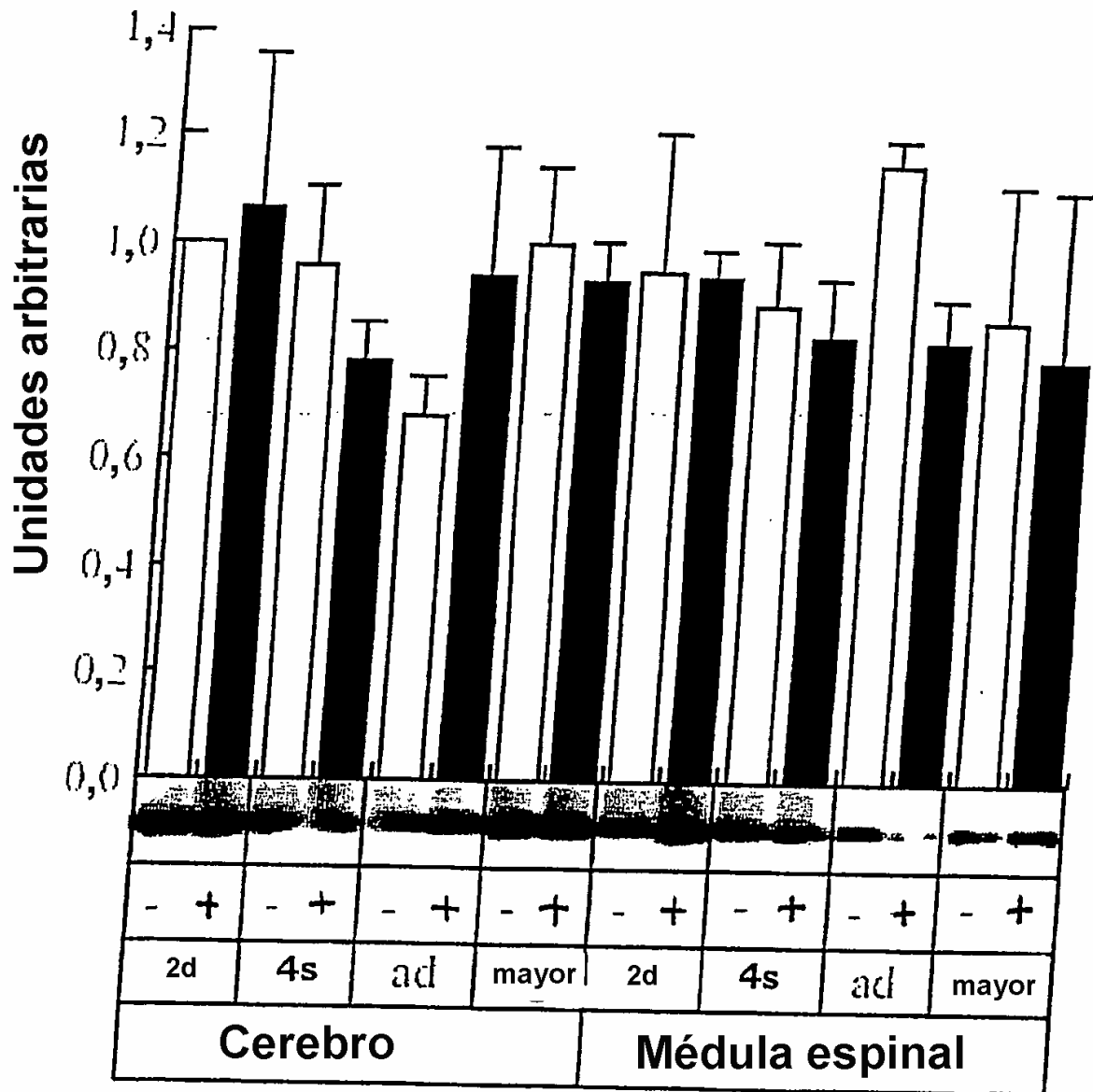
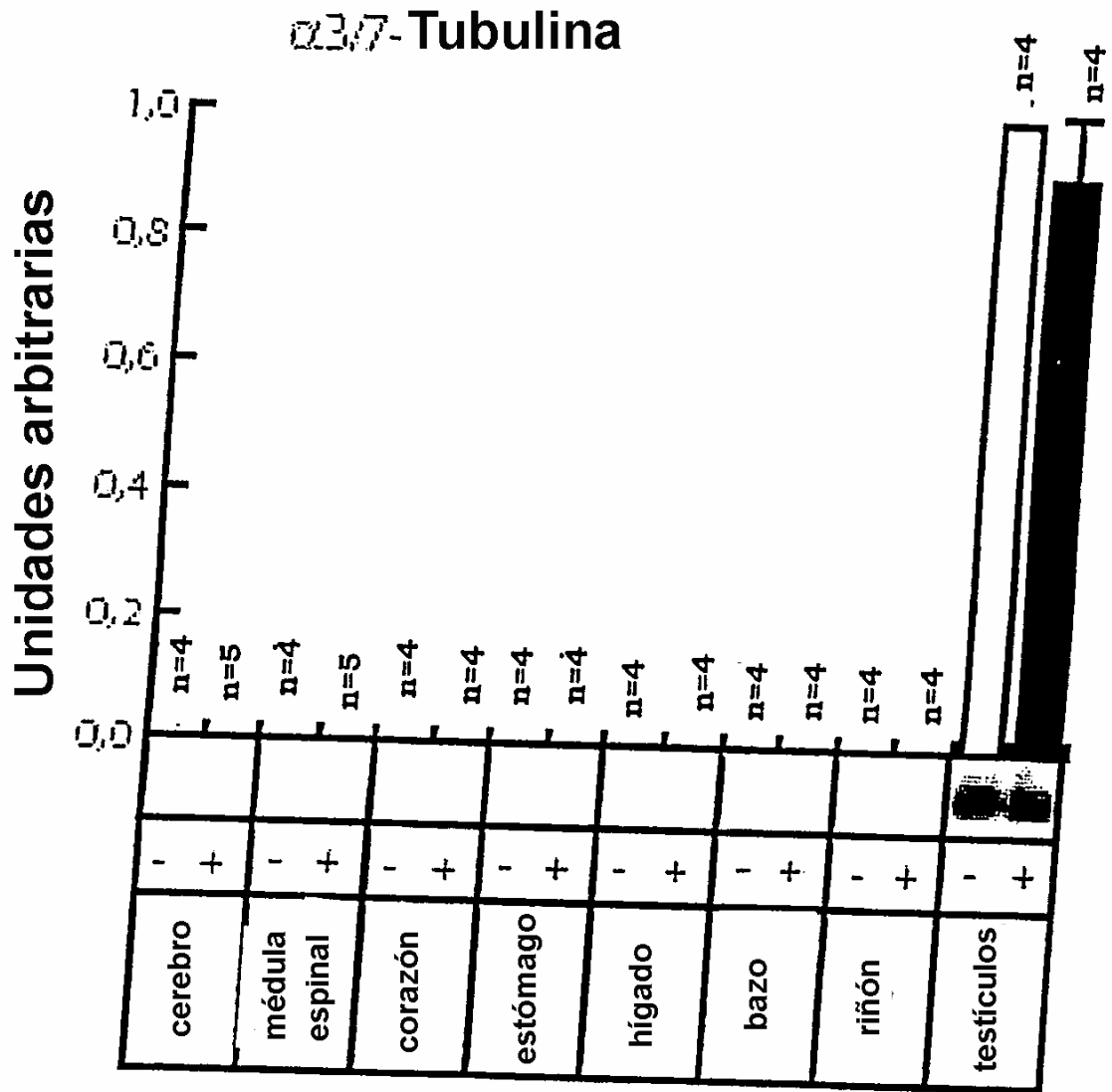


Figura 4B





**Figura 4C**

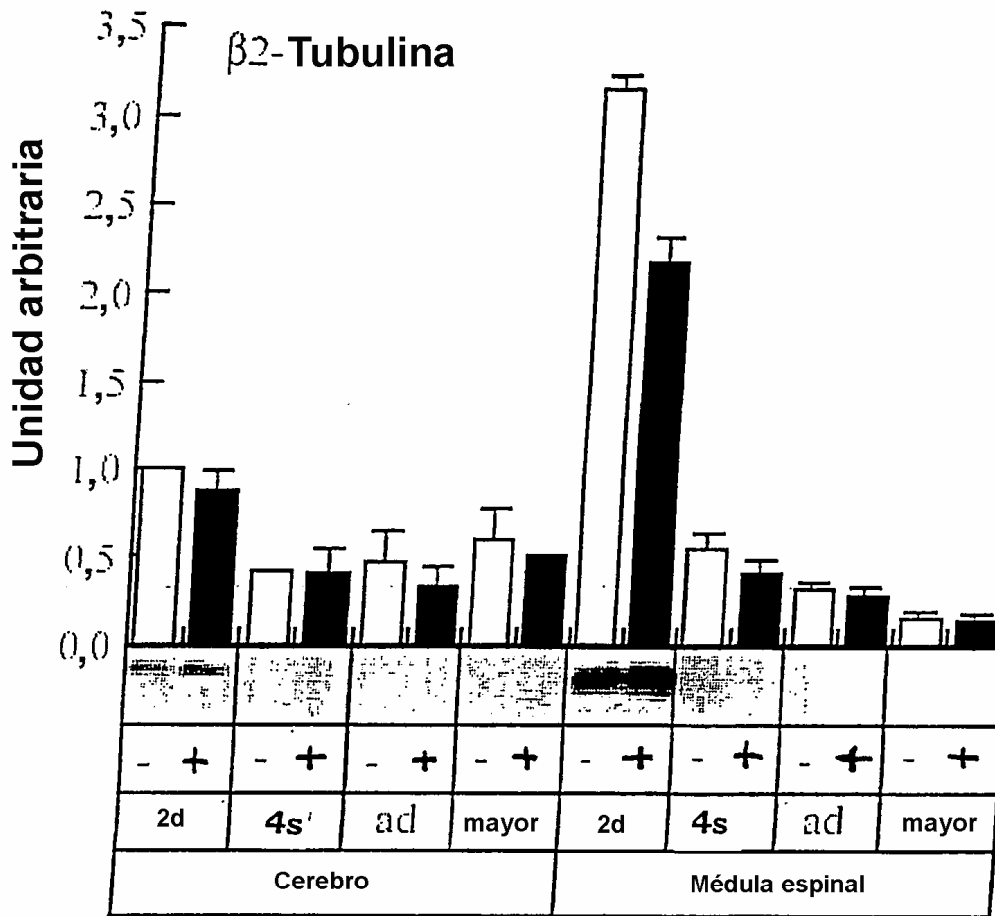


Figura 5A

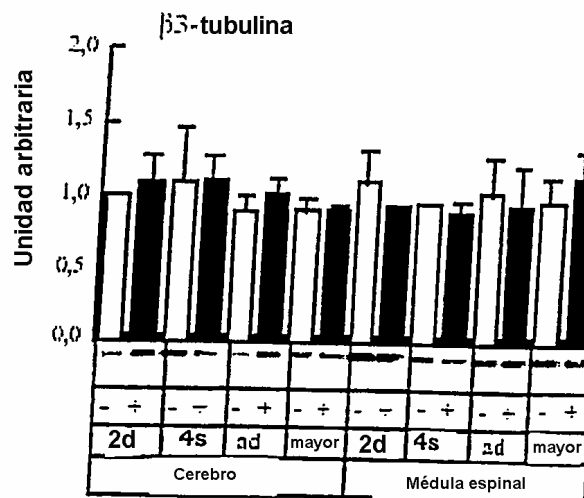


Figura 5B

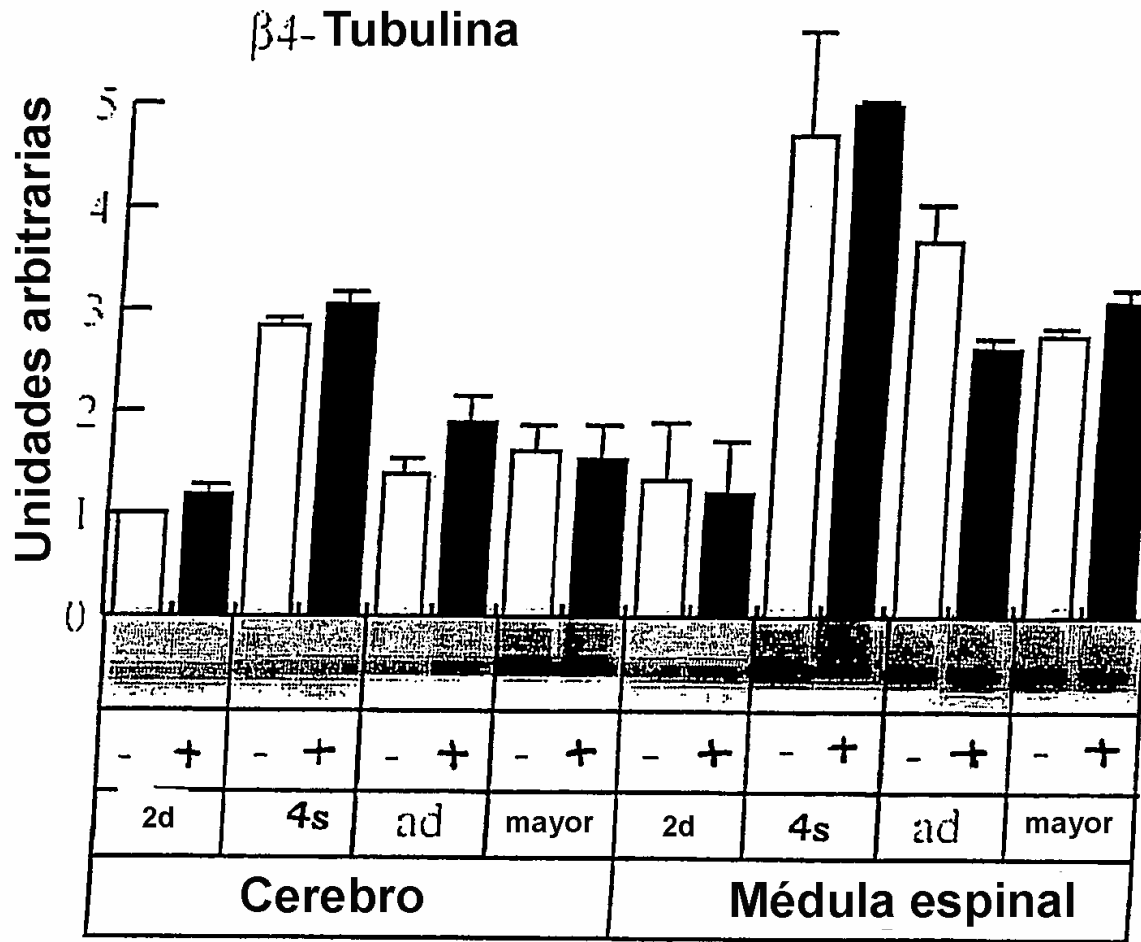


Figura 5C

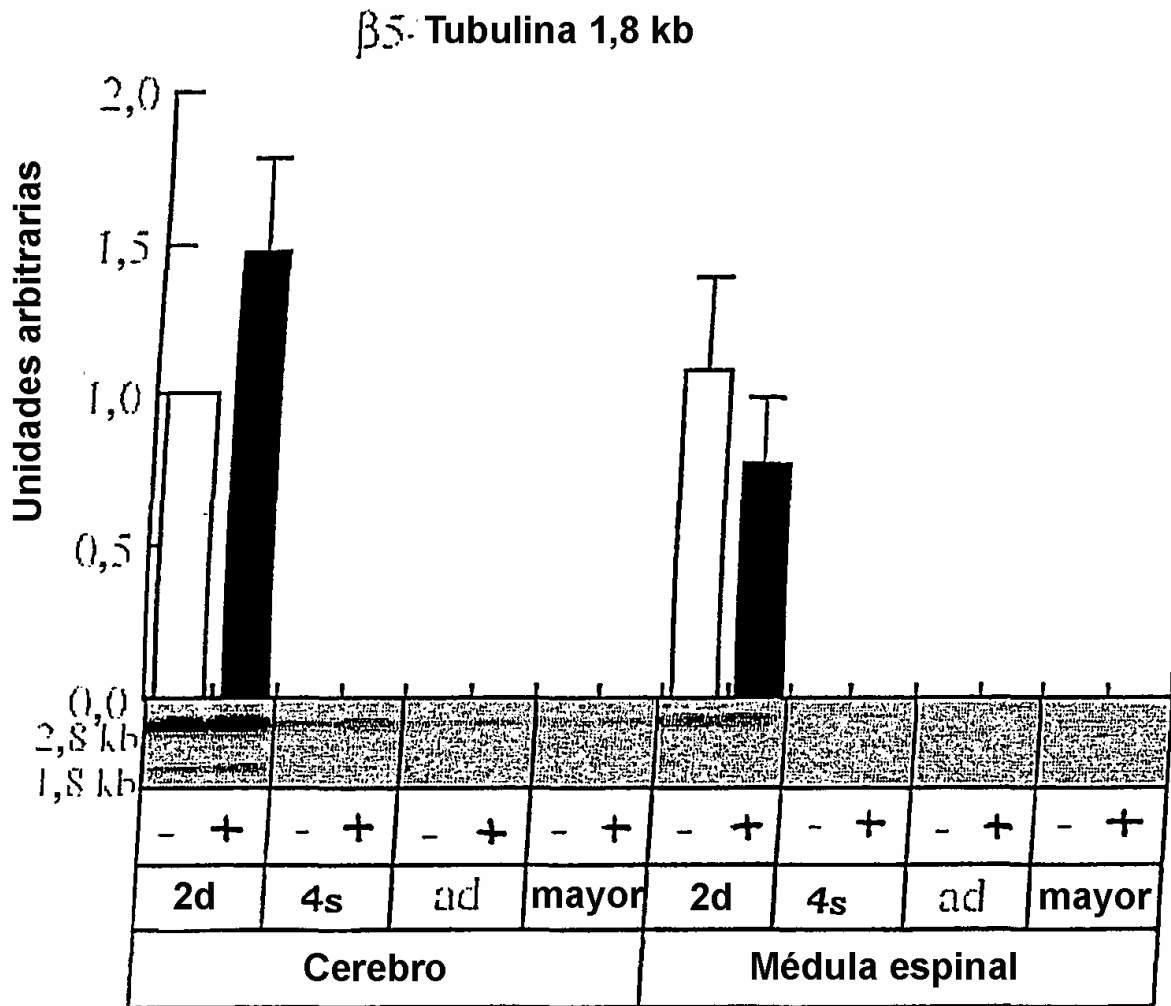


Figura 5D

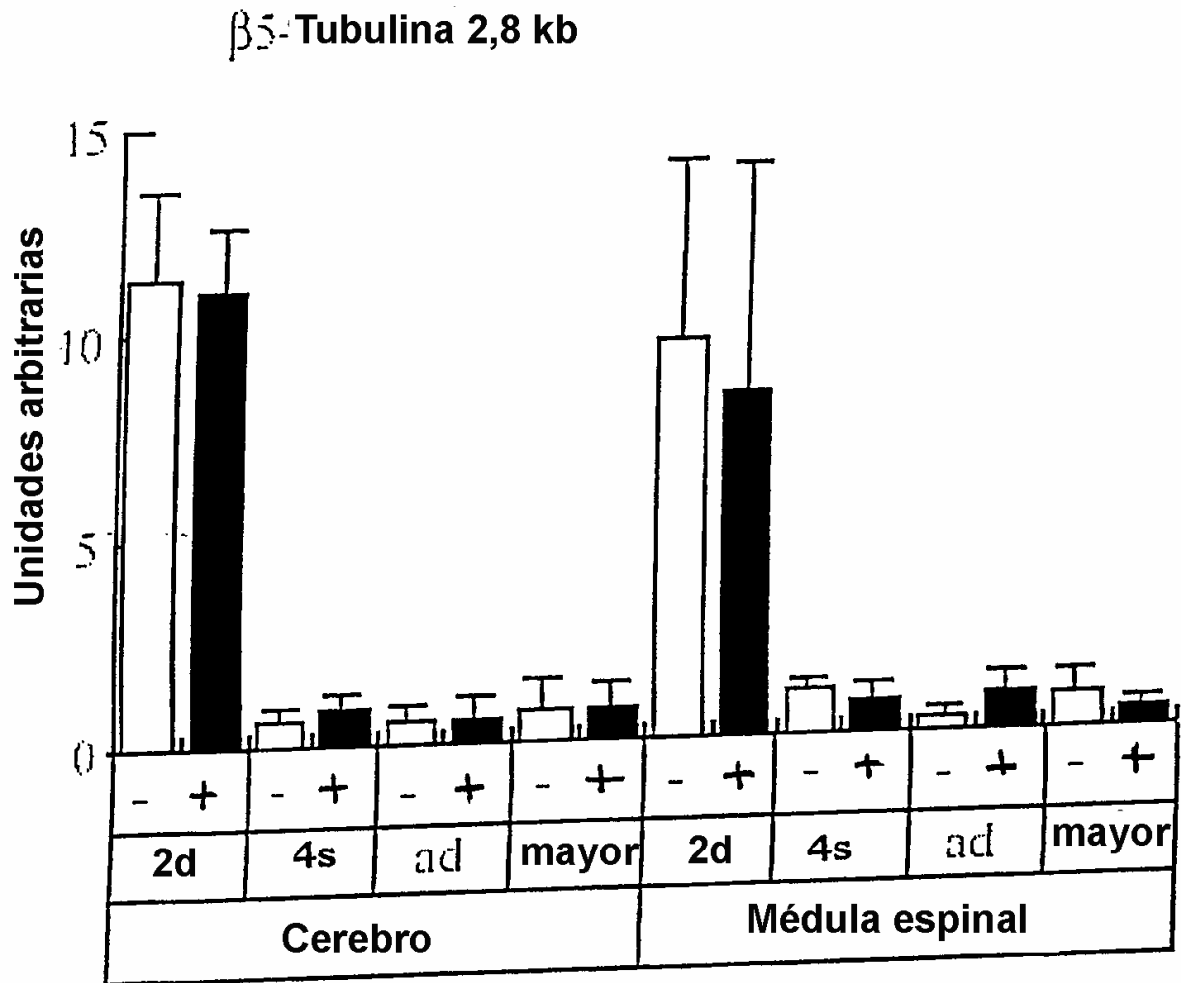


Figura 5E

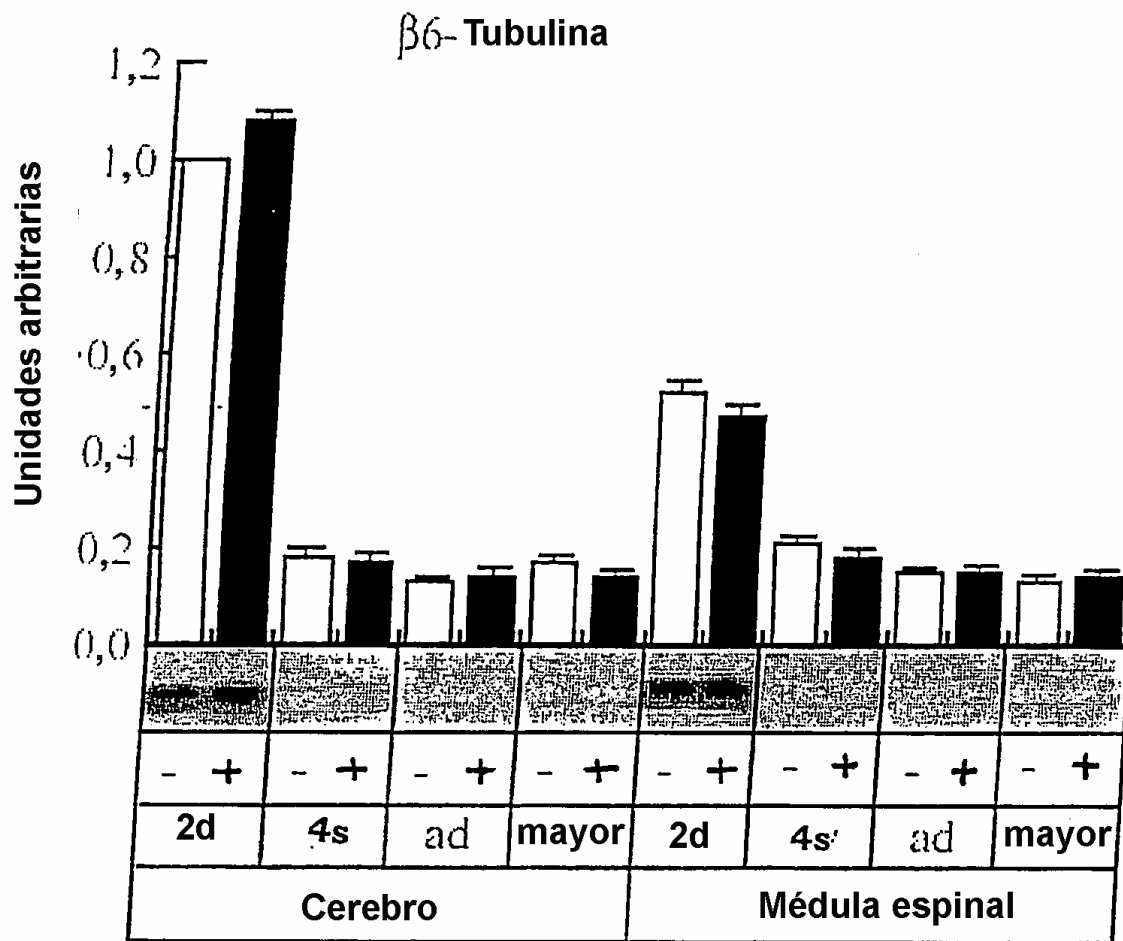


Figura 5F

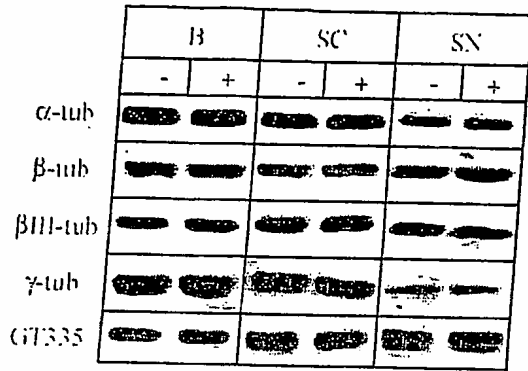


Figura 6A

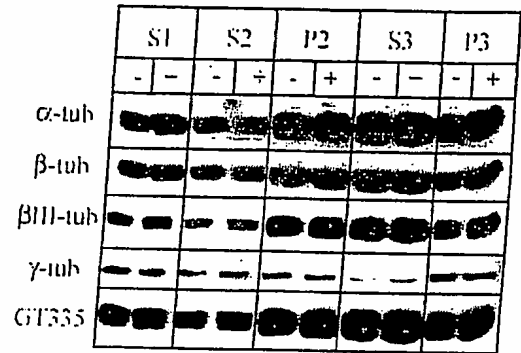


Figura 6B

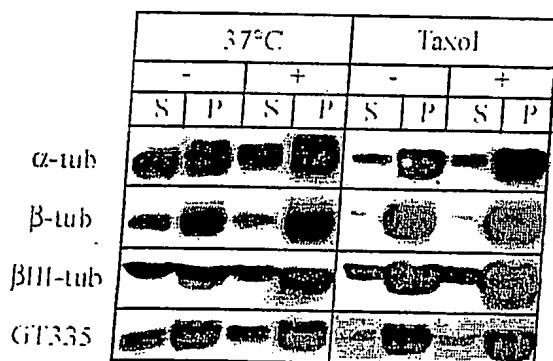


Figura 6C

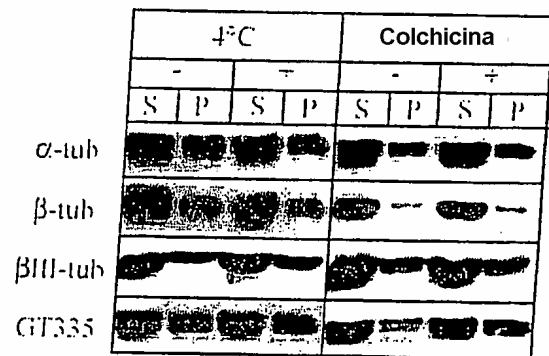


Figura 6D

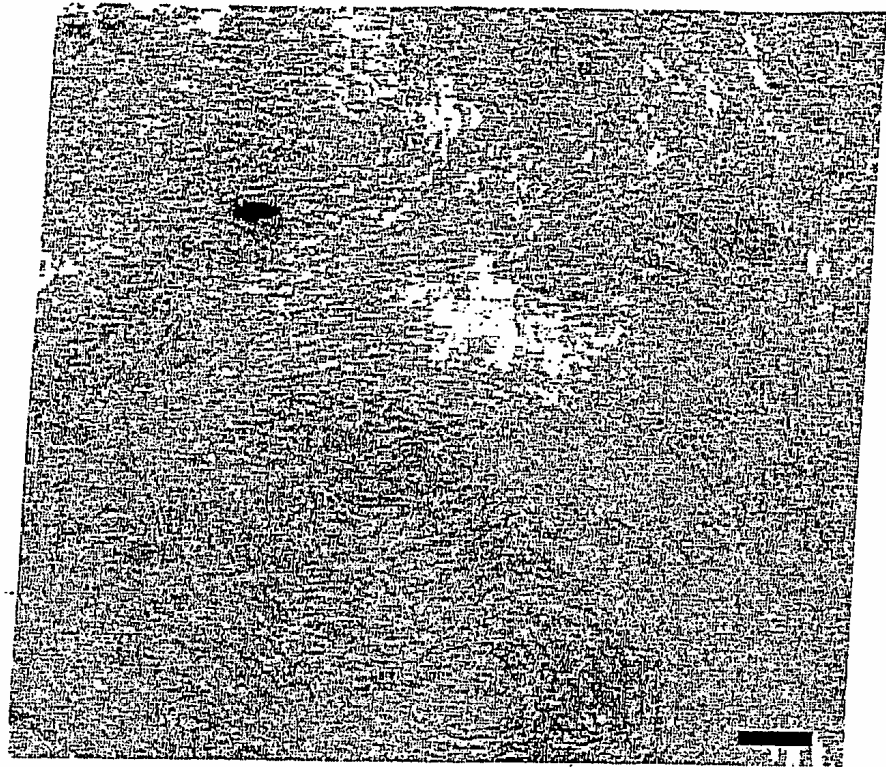


Figura 7A

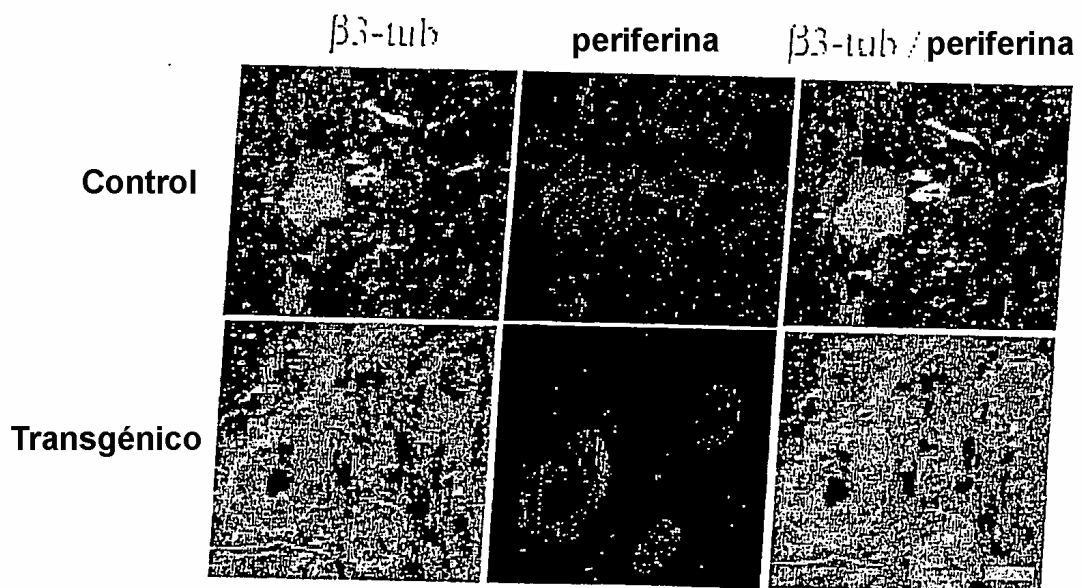


Figura 7B



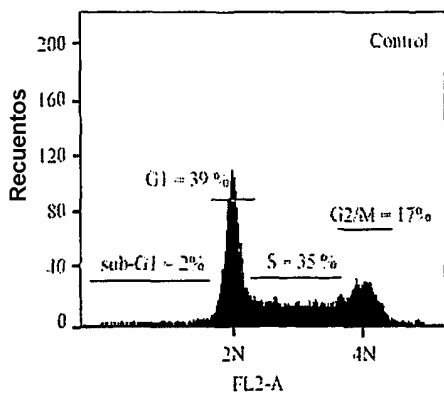
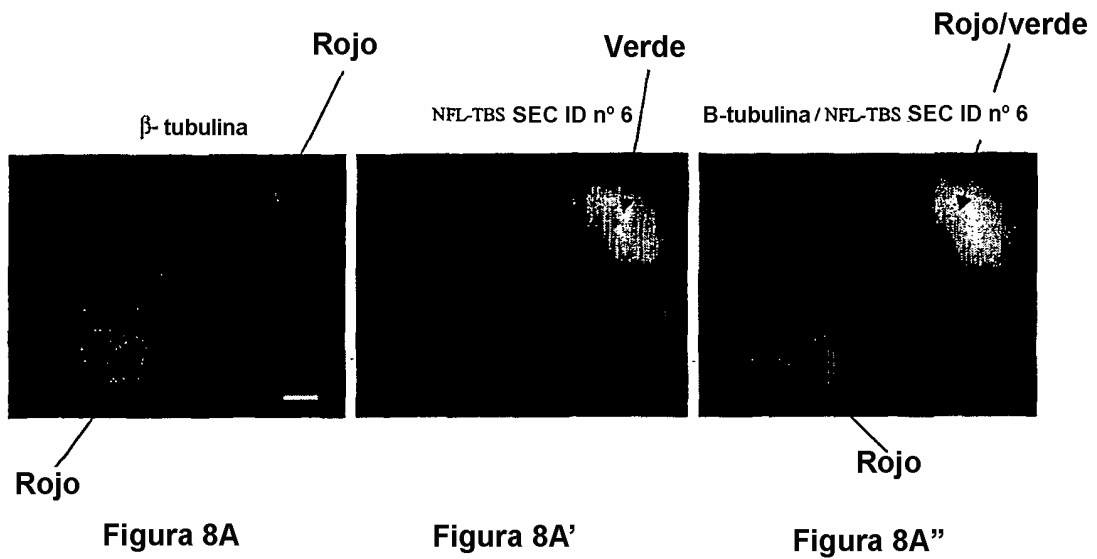


Figura 8B

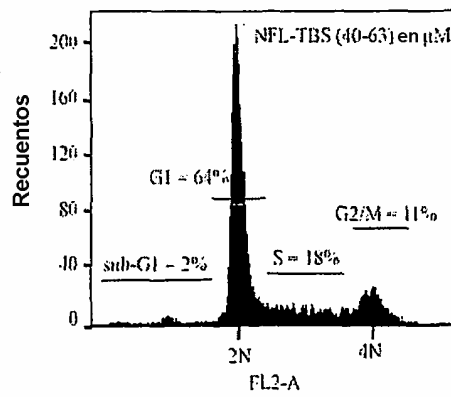


Figura 8B'

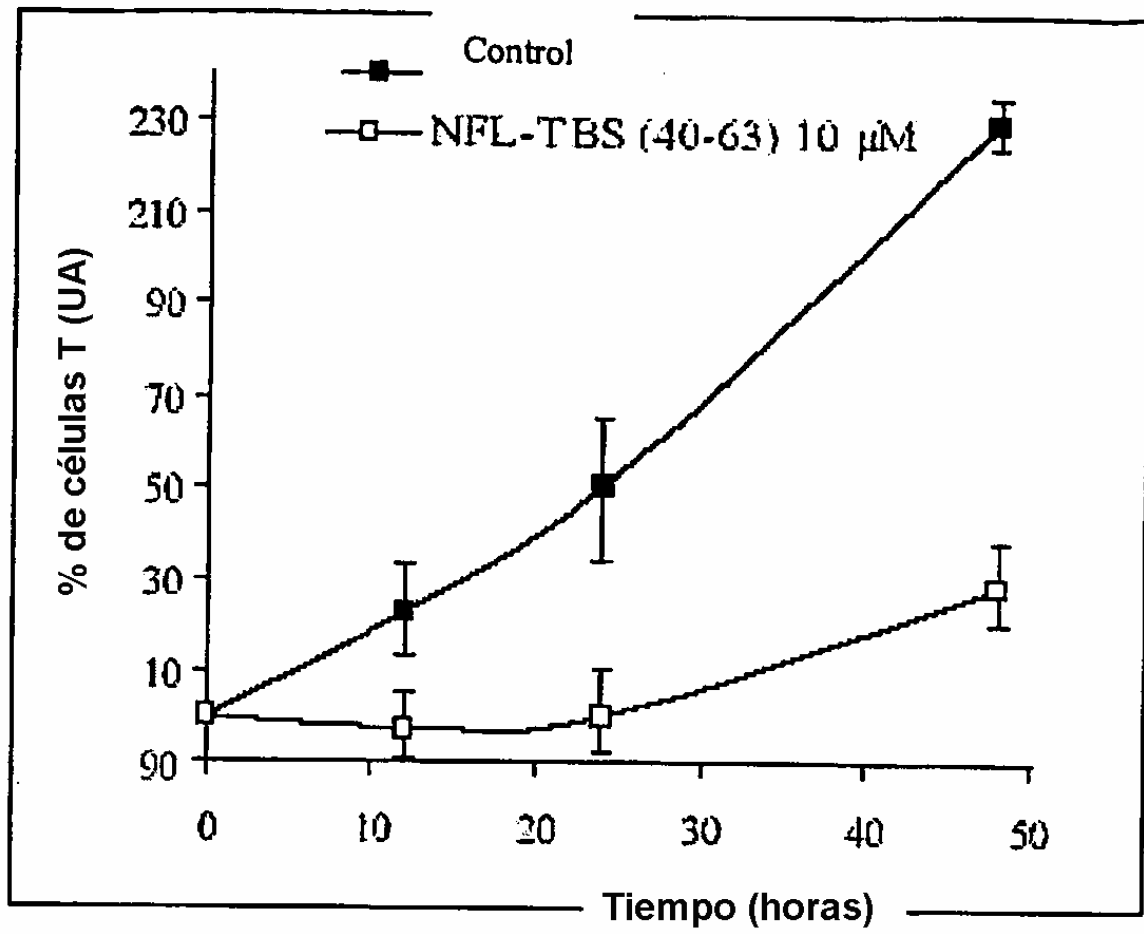


Figura 8C

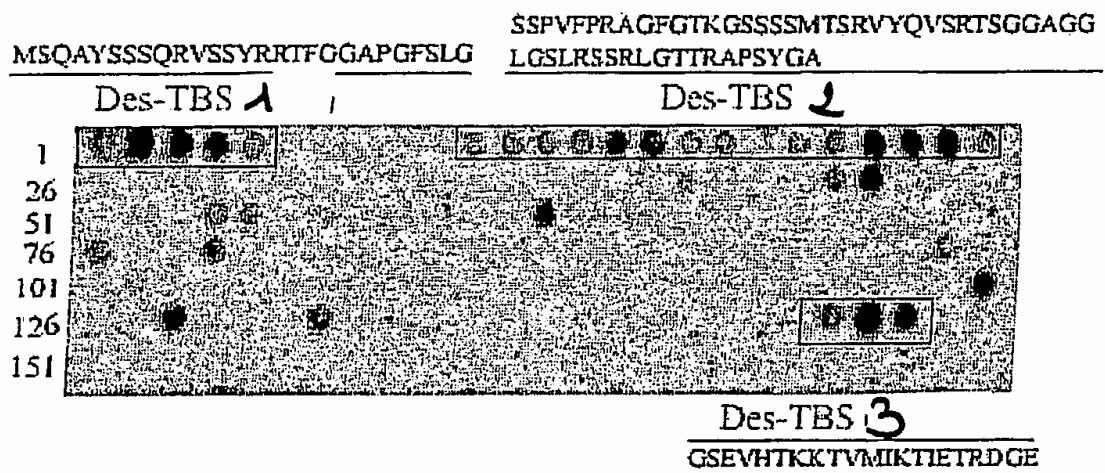


Figura 9A

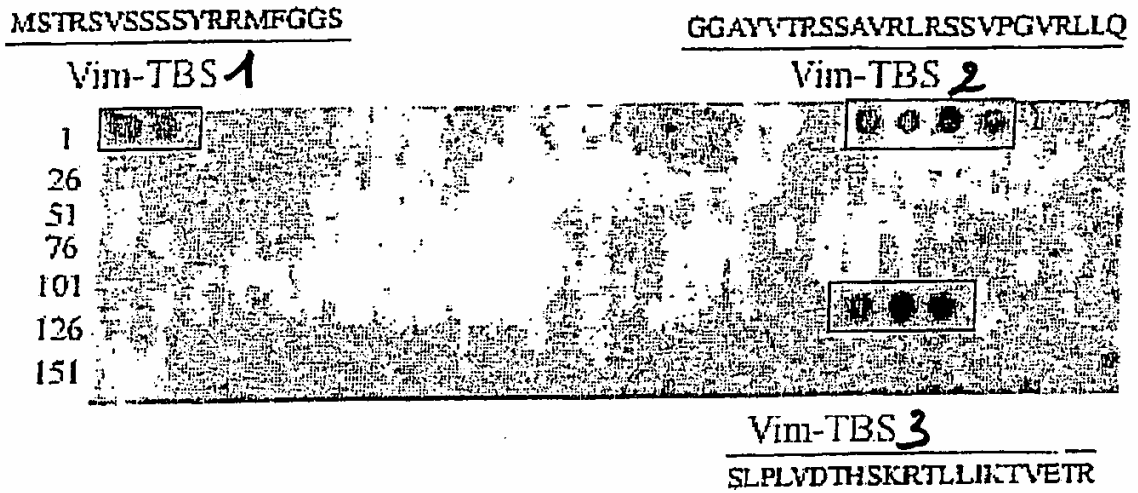


Figura 9B

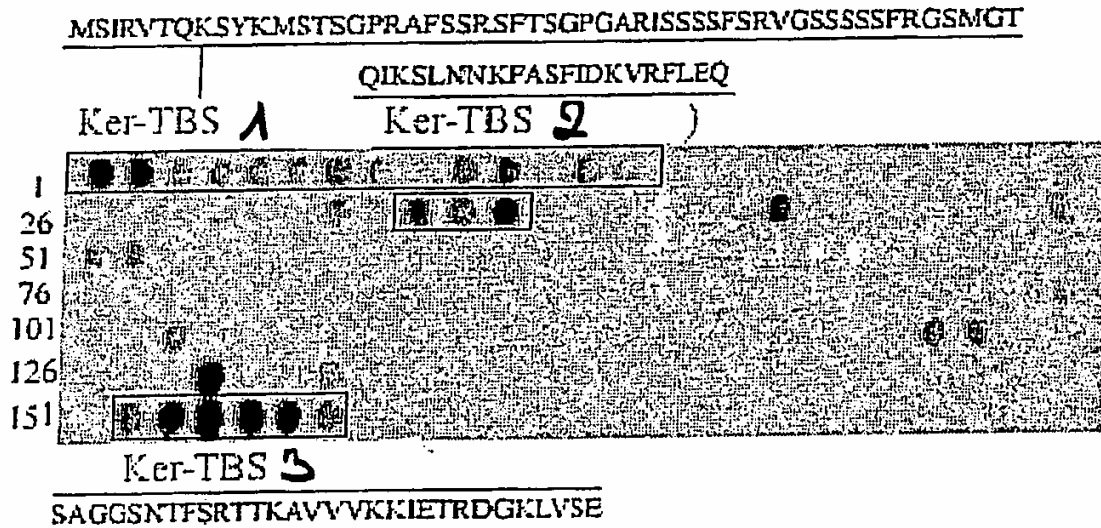
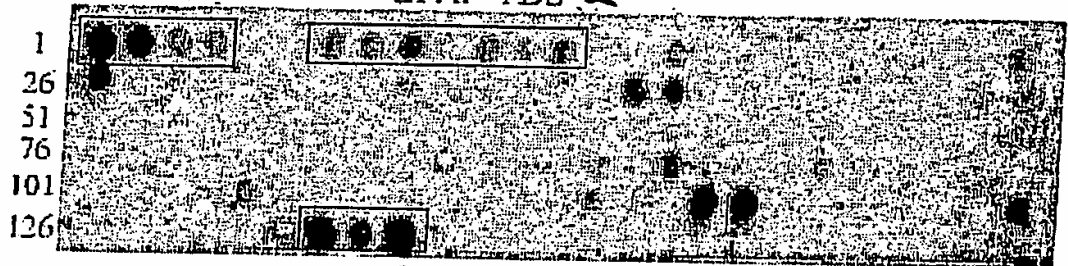


Figura 9C

MERRRITSARFSYASETVVRGLGP VRGLGPSRQLGTMPPRFSLSRMTPLPARVDFSLAGA

GFAP-TBS 1

GFAP-TBS 2



GFAP-TBS 3

KSVSEGLKRNIVVKTVMRD

Figura 9D

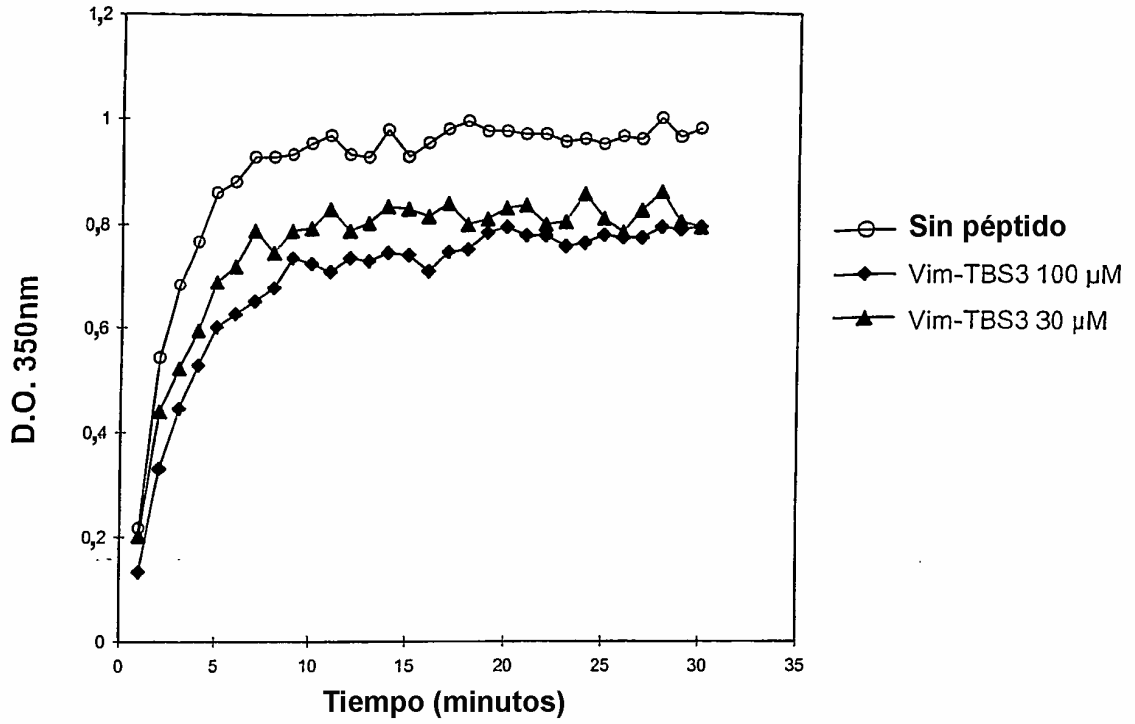


Figura 10A

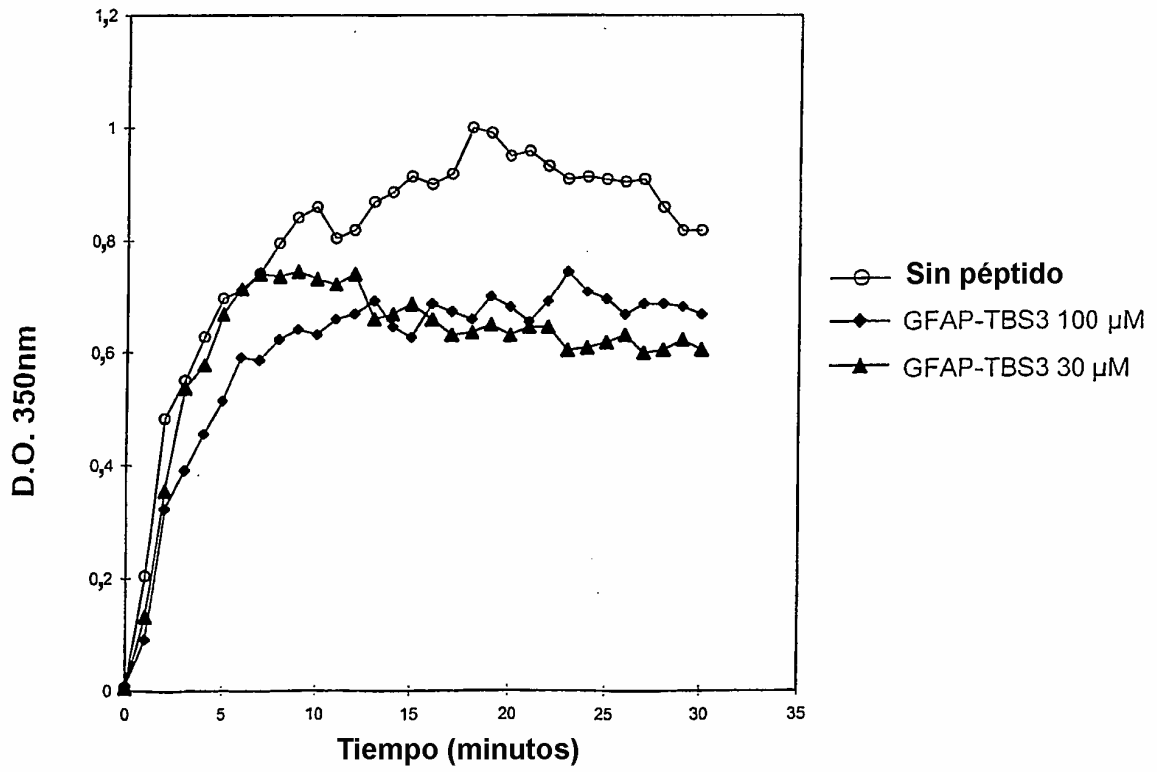


Figura 10B

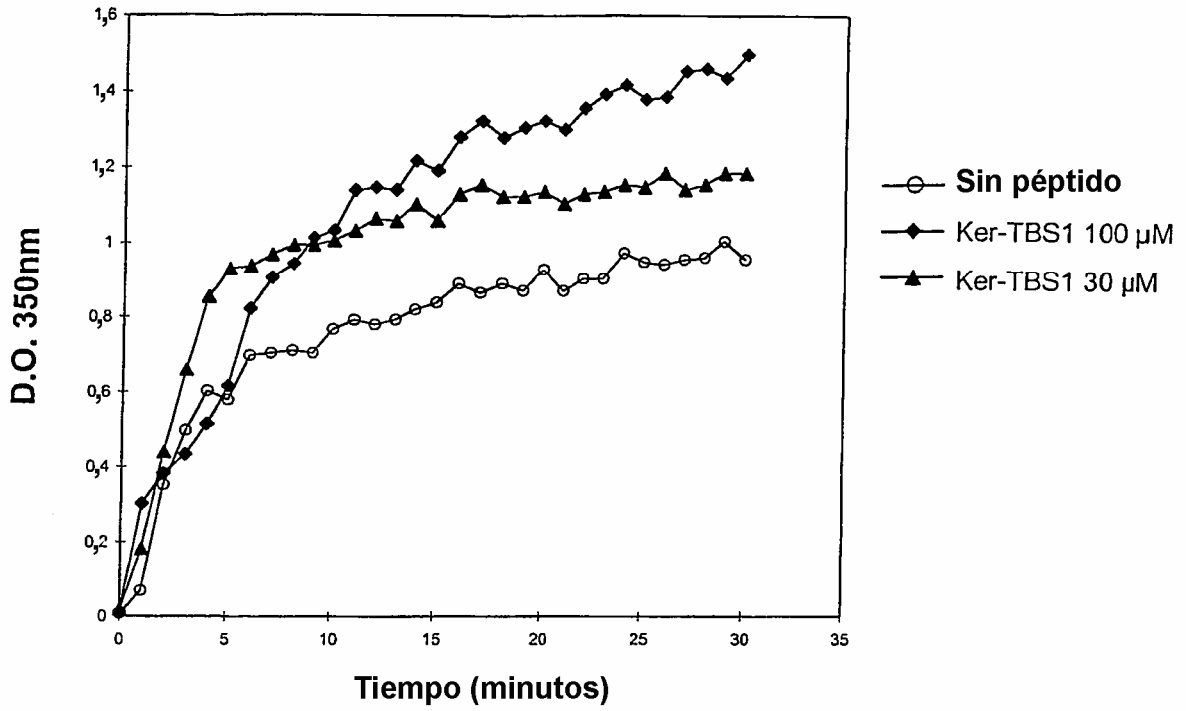


Figura 10C

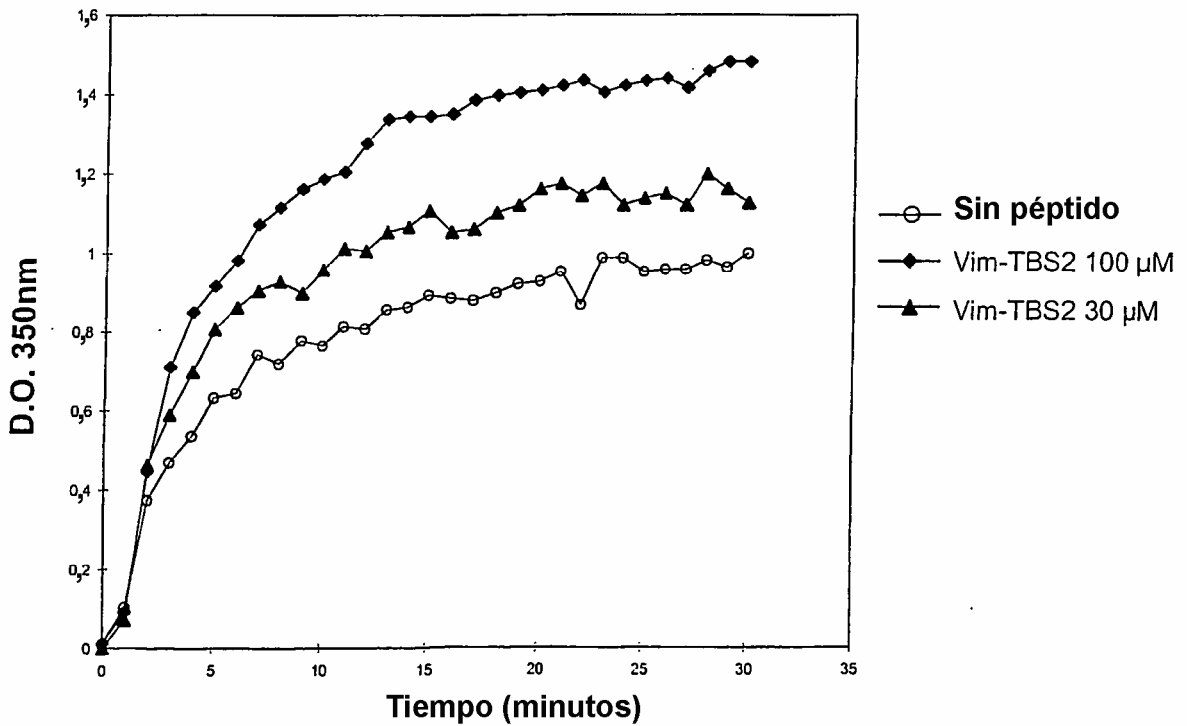


Figura 10D

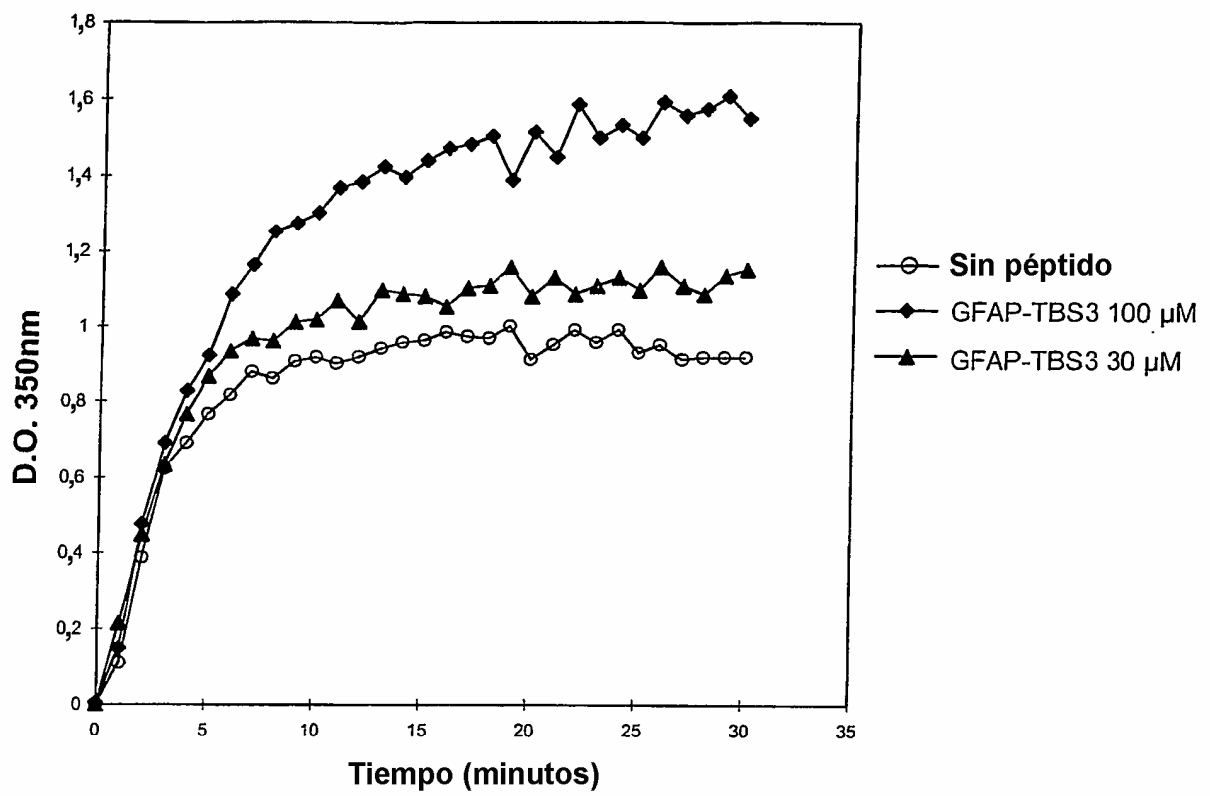
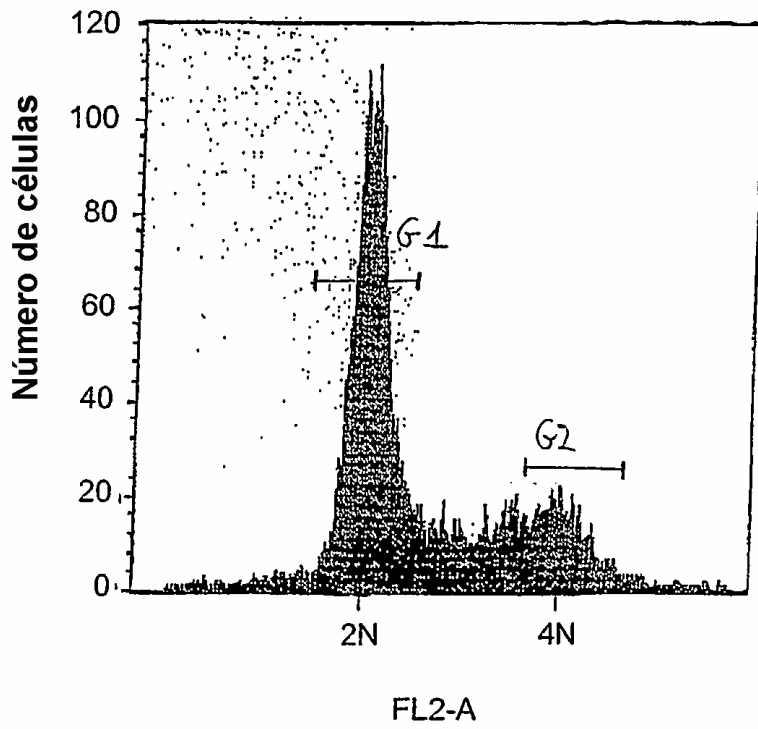
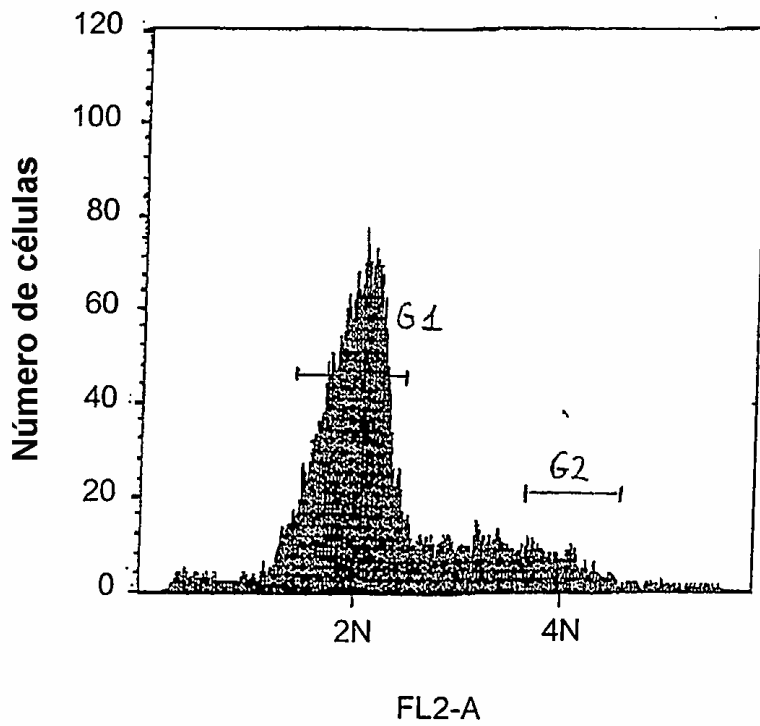


Figura 10E





Sin péptido



GFAP-TBS  
100  $\mu$ M

Figura 11