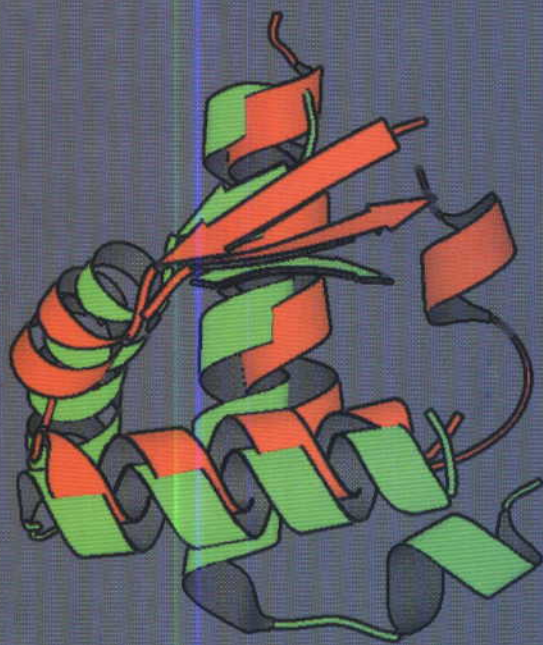


Centro de Investigaciones Biológicas

1999/2000



MEMORIA CIENTÍFICA 1999/2000

Centro de Investigaciones Biológicas



CSIC

Velázquez, 144 - 28006 Madrid, España

Teléfono: (349) 564-4562 ó 561-1800

Fax: (349) 562-7518

Cubierta

Cover

Fotografía derecha

Núcleo de dinoflagelado (*A. lusitanicum*) con cromosomas interfásicos condensados formados por fibras elementales de DNA no nucleosómico. Microscopía electrónica de transmisión. (Dra. S. Moreno Díaz de la Espina).

Right picture

Dinoflagellate Nucleus (A. lusitanicum) with condensed interphasic chromosomes consisting of elementary non-nucleosomic DNA fibres. Transmission electron microscopy. (Dra. S. Moreno Díaz de la Espina).

Recuadro

Las proteínas iniciadoras de la replicación del DNA de los plásmidos en bacterias Gram-negativas (Rep) y de los cromosomas en arqueas y eucariotas (ORC/Cdc6) comparten un módulo estructural y por ello un probable origen filogenético común. La figura muestra la superposición de los esqueletos peptídicos de los dominios "winged-helix" de una proteína Rep (RepE54, en rojo) y de un ortólogo del iniciador eucariótico Orc4 (Cdc6, en verde). (Dr. R. Giraldo y Dr. R. Díaz-Orejas)

Insert:

The proteins that initiate DNA replication of plasmids in Gram-negative bacteria (Rep) and of chromosomes in archaea and eukaryotes (ORC/Cdc6) share a structural module, and thus a possible phylogenetic origin in common. Figure shows the superposition of the peptide backbones of the "winged-helix" domains of a Rep protein (RepE54, in red) and an archaeal ortholog of the eukaryal initiator Orc4 (Cdc6, in green). (Dr. R. Giraldo y Dr. R. Díaz-Orejas)

Fondo: Estatua sita en el edificio del CIB

Background: Sculpture located at the CIB building

Coordinación Editorial: José Luis Díez Cortés
M^a Victoria Lafita
Vicente Larraga
Fco. Javier Medina
Félix Ortego

Agradecimientos: Mónica M^a Fontela Lago, Victoria Muñoz Martín y José Ramón Díez Bueno

Maquetación: Pedro Santiago García Romero-Nieva
Imprime: Gráficas Ruiz Polo, S.A.

TABLA DE CONTENIDOS

— Introducción.....	V
— Recuerdos del CIB (Prof. ANTONIO PORTOLÉS).....	VII
— Dpto. de Biología Celular y del Desarrollo	1
Biología Molecular de los Cromosomas Eucarióticos	2
Reproducción Celular	8
Estrés y Muerte Celular	11
Regulación de la Expresión de Genes Eucariotas	15
Control Transcripcional en Eucariotas	18
Segregación y Eliminación de Cromosomas en Organismos Eucariotas.....	22
Citogenética Molecular	25
Biología del Desarrollo de <i>Drosophila</i>	27
Biología Molecular de la Gametogénesis	31
Biología de la Reproducción	36
Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados	39
— Dpto. de Biología de Plantas	45
Matriz Nuclear y Regulación de la Organización y Funcionalidad Nuclear	46
Nucleolo de Células Vegetales	51
Desarrollo de Plantas y Organización Nuclear	55
Patogénesis de Virus de Plantas y Mecanismos de Resistencia en Plantas	61
Virología Molecular de Plantas	64
Interacciones Planta-Insecto	69
— Dpto. de Estructura y Función de Proteínas	73
Bioquímica y Biología Molecular del Oxido Nítrico	74
Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores	78
Biología Estructural de Proteínas	82
Biología Molecular de Bacterias Gram-positivas	85
Bioquímica de <i>Leishmania</i> . Péptidos Antibióticos Eucarióticos	90
Las Proteínas de División Celular FtsZ y Tubulina. Métodos bioinformáticos	93
Parasitología Molecular	99
Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-positivas	103
Fotobioquímica Vegetal	107
Interacciones Macromoleculares	111

— Dpto. de Fisiopatología y Genética Humana.....	115
Fijación Directa del N ₂	116
Genética Humana	117
Marcadores Tumorales y Procesos de Envejecimiento	119
Metabolismo y Patología Molecular	122
Microbiología Aplicada	125
— Dpto. de Inmunología	127
Activación de Linfocitos T.....	128
Adhesión Celular en el Sistema Inmune	134
Biología Celular de las Moléculas de Adhesión	138
Receptores de Membrana	142
Terapia del Cáncer: Activación de los Mecanismos de Apoptosis	148
Mecanismos Celulares de Acción de Taxoides Fluorescentes	154
Diferenciación de Linfocitos Humanos	157
Genética del Complemento	160
Virología Molecular de <i>Vaccinia</i>	165
— Dpto. de Microbiología Molecular	169
Biodegradación de la Lignina	170
Bioquímica de Hongos	178
Virología en Acuicultura	181
Carbohidratos Microbianos	185
Genética Bacteriana	188
Biotecnología Medioambiental	193
Genética Molecular de <i>Aspergillus</i>	200
Iniciadores e Inhibidores de la Replicación del DNA en Microorganismos	204
Biología Molecular de Hongos Basomicetos	208
— Premios y Distinciones.....	213
— Organización de Congresos y Cursos.....	215
— Seminarios del Centro.....	217
— Dirección, Gerencia y Servicios	225
— Organigrama	230
— Altas, Excedencias y Jubilaciones	231
— Resumen de Datos Económicos.....	232
— Evolución del Número de Publicaciones y su Impacto.....	233
— Índice Alfabético de Investigadores y Teléfonos.....	235

INTRODUCCIÓN

JUAN M. RAMÍREZ DE VERGER
Director

Por segunda vez consecutiva me corresponde presentar la memoria científica del Centro de Investigaciones Biológicas, en esta ocasión la del último bienio del siglo y, esperemos que también, la del último período que incluye exclusivamente actividades desarrolladas en el viejo edificio de las calles de Velázquez y Joaquín Costa: tras innumerables inconvenientes y dilaciones, parece ya inminente la mudanza al nuevo edificio de la calle de Ramiro de Maeztu en el campus de la Universidad Complutense. Confiemos en que los retrasos queden compensados por la garantía de que las nuevas instalaciones van a funcionar correctamente desde el primer momento cuando, por fin, llevemos a cabo el traslado. Quiero reconocer aquí el gran esfuerzo del personal de nuestros Servicios Técnicos, que lleva meses revisándolas y corrigiendo las múltiples deficiencias que presentan.

El contenido de la memoria pone de manifiesto que la actividad desarrollada en el Centro se mantiene en el nivel de calidad alcanzado en períodos anteriores y que, dentro de la variabilidad que es de esperar de un centro del tamaño y la naturaleza del nuestro, una fracción importante de nuestros grupos de investigación son francamente competitivos en su parcela específica de actividad. Y aunque resulta algo arriesgado calificar los resultados obtenidos en una línea particular de investigación como los de mayor interés o trascendencia, por la facilidad con que se puede errar al emitir un juicio sobre las posibles repercusiones de la investigación básica a medio y largo plazo, quiero mencionar aquí el análisis de las bases moleculares de la alcaptonuria, trabajo realizado en colaboración entre grupos de los departamentos de Inmunología y de Microbiología Molecular, como uno de los más llamativos entre los que se han completado en el bienio que cubre la presente memoria.

En contraste con la actividad de los grupos de investigación, la memoria no refleja explícitamente la de los servicios del Centro. Sin embargo, su buen funcionamiento repercute

directamente en el desarrollo de los programas, proyectos y contratos, y es uno de los factores que hacen al Centro atractivo como lugar de trabajo. La atracción está documentada por el hecho de que siete investigadores de carrera de otros institutos del Consejo han solicitado oficialmente su incorporación al nuestro, y se refleja también en que resulta muy difícil convencer a algunos de nuestros propios investigadores de que se trasladen a otros centros de temática más acorde con su tipo de actividad; y todo ello a pesar de los graves problemas de espacio de laboratorio que tenemos y que continuaremos teniendo en la nueva sede. De nuevo, también resulta difícil destacar la importancia de un servicio sobre las de los demás. Por eso sólo mencionaré a los de mayor repercusión externa: el de Secuenciación de DNA, que ha actualizado recientemente su infraestructura para poder satisfacer el incremento de la demanda, en variedad y número, de las prestaciones ofrecidas, y la Biblioteca, que continúa siendo la de mayor actividad de todo el CSIC en número de documentos solicitados y facilitados.

Para acabar esta introducción, quisiera mencionar que, tras un largo período de escasez de plazas, la tendencia ha experimentado en el bienio un cambio positivo que ha resultado en la incorporación de siete nuevos Científicos Titulares a cinco de nuestros departamentos, y en la promoción a niveles superiores de otros seis compañeros. Aunque estos números son insuficientes para compensar el déficit acumulado en los años anteriores y no llegan a tiempo de corregir daños irreversibles, crean expectativas de futuro para los que están iniciando su profesión investigadora y suponen un reconocimiento para los que, ya con una posición estable, llevan años en los puestos inferiores de las escalas correspondientes.

INTRODUCTION

JUAN M. RAMIREZ DE VERGER
Director

It is for the second time that I have to introduce the biennial Scientific Report of the Biological Research Centre (CIB) of the Spanish Research Council (CSIC), the last report of the century and, hopefully, the last one, too, that includes work only performed in the old building at the crossing of Velázquez and Joaquín Costa streets: after never ending problems and delays, it seems that the moving to the new premises at the campus of the Complutense University is very close. Let us hope that the long wait may have at least a positive effect on the reliability of the new installations: our technical staff has had the chance to spend several months testing them and trying to correct their numerous deficiencies.

The contents of the present report illustrates that the scientific activity of the CIB remains at the level reached in previous years and, within the variability expected from an institute of our characteristics and size, that a significant part of our research groups are fairly competitive in their own fields of activity. Even though it may seem risky to state that the results of any particular research line are the most interesting or important, since it is easy to make an erroneous judgement on the future relevance of a piece of basic research, I will take the risk and point out the analysis of the molecular bases of human alkaptonuria, carried out in collaboration between groups of our Immunology and Molecular Microbiology departments, as one of the most outstanding results among those obtained within the couple of years covered by this report.

In contrast with the activity of the research groups, the work of the general services of the CIB is not described in the report. However, their correct functioning influences to a considerable extent the ability of the groups to successfully carry out their programs, projects and contracts, and is one of the factors that make our Centre attractive as a working place: in the last year we had applications to join the CIB from 7 career scientists who were working at the moment at other CSIC institutes, in spite of the severe shortage of lab space that we

presently have and that we shall continue to have in the new building. Again, it is also difficult to direct the reader's attention to a particular service as the most important. Thus I shall mention here only those that are more used by people outside the CIB: DNA Sequencing, which recently updated its instruments to cope with the increase in internal and external demand for analyses, and our Library, that keeps its first place among those in the CSIC in number of documents supplied to external users.

I would like to finish this introduction mentioning that after several years with a very low rate of positions opening, in the period of the report we have incorporated 7 new staff scientists to 5 of our departments, while 6 other members of our staff have been promoted. Even though these numbers are still low and come too late, they raise expectations for both the young people that are starting their careers and the seniors that have spent several years working hard at the low levels.

RECUERDOS DEL CIB

EL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS EN EL TRANSCURSO DEL TIEMPO

Antonio Portolés

*Las ciencias aplicadas no existen, lo que
existe son las aplicaciones de las ciencias.*

Louis Pasteur.

Cumplido ya el medio siglo desde que el Consejo Superior de Investigaciones Científicas encargara al arquitecto Miguel Fisac el proyecto de construcción de un edificio en el que reunir varios de sus institutos de investigación dispersos por diferentes zonas de la capital, creo que merece la pena resaltar lo que este singular Centro ha ido significando para la Ciencia Española. No puedo evitar, por tanto, que en esta ocasión tan próxima a la inauguración de un nuevo Centro de Investigaciones Biológicas, mi memoria discurrendo por el laberinto del tiempo me traiga recuerdos de lo que supuso la construcción de este edificio de la madrileña calle Velázquez, ...el de la señora fuente representando "al hombre que con su ciencia taponó el orificio por donde la vida se escapa" y con aquel otro pequeño surtidor, localizado en el jardín y "dedicado al ratón de laboratorio", un simpático monumento de efímera vida por culpa de caprichosos depredadores nocturnos.

Cuando se empezó a construir nuestro antiguo Centro, uno era todavía un joven becario postdoctoral del Instituto "Jaime Ferrán" que, junto con otros y liderados por el Dr. Socías, iba todos los sábados a comprobar cómo tomaban forma los flamantes laboratorios donde pensaban alojarnos, puesto que estábamos recogidos en el Instituto "Torres Quevedo". Mientras, el Instituto "Ramón y Cajal", permanecía en la Escuela de Ingenieros del Retiro, y otros institutos estaban distribuidos por diversas Facultades de la capital.

En principio, el edificio iba a ser destinado para acoger tan sólo a los Institutos Cajal y Ferrán, con una gran torre en el ángulo para animalarios comunes de ambos centros. Sin embargo, pronto la realidad de la situación científica en España y la presión de las distintas "etnias de investigadores" consiguieron modificar este criterio y así, fueron varios los institutos que, de un modo definitivo, habrían de quedar alo-

jados allí mediante un mejor aprovechamiento de los espacios para laboratorios y a costa de que los animalarios de la torre fueran bastante más reducidos ¿Os imagináis a personalidades científicas de la época como Marañón, Sanz Ibañez, Socías, Burriel, Rodríguez Candela, Castro, Carrato y Arteta, principalmente, justificando las necesidades de sus grupos científicos para conseguir laboratorios distribuyéndose por pasillos, alas, plantas, etc.? Todavía no se había descubierto "el módulo ventana", que tantas discusiones zanjaría entre nosotros posteriormente.

Así se inició la andadura de nuestro Centro y, con tan escasos grupos científicos empezó a convertirse en el germen para la formación del primer núcleo profesional de investigadores españoles. Su vital competitividad generó activos procesos de gemación, dando lugar al desarrollo de muy diversas líneas de investigación en función de las posibilidades económicas de cada instituto o departamento, ya que cada grupo, por su parte, intentaba conseguir ayudas de distintas instituciones e industrias.

Aunque según Shakespeare *"el tiempo lleva en su espalda una alforja en que va echando las limosnas que recoge para el olvido"*, aquellos que pertenecemos al ayer del primitivo Centro, todavía podemos recordar las muchas dificultades y carencias sufridas hasta avanzados los años sesenta en los que, pese a las deficiencias de infraestructura se empezaron a conseguir más medios de trabajo. Al acceder a la Dirección del Centro a mediados de los setenta, pude comprobar los muchos sacrificios y esfuerzos que hacían los distintos grupos científicos en su afán de mantener un nivel digno de investigación junto a otros equipos extranjeros, mejor dotados económicamente, y con los que se establecían estrechas relaciones de trabajo científico. La febril actividad, desarrollada desde el principio por todos los investigadores iba atrayendo

nuevos becarios, sobre todo al reclamo de los Planes de Formación de Personal Investigador. Esto y el retorno de los primeros colaboradores que habían completado su formación en distintos centros del extranjero propició la organización de nuevos departamentos como los de Enzimología, Biología Molecular y Endocrinología, así como también algunos nuevos Institutos como el de Biología Celular y el Departamento de Genética.

Singularmente, la década de los setenta estuvo repleta de accidentes y cambios estructurales; así, en junio del 73, hubo necesidad de vencer las dificultades derivadas de una catastrófica explosión en la calle de Joaquín Costa, que destruyó parte del edificio y afectó esencialmente al Instituto "Jaime Ferrán" y particularmente a nuestros laboratorios del sótano donde teníamos instalados dos sistemas para cultivo continuo de microorganismos y que, ni que decir tiene, hubimos de rehacer lo más rápidamente posible en otra zona del instituto para no entorpecer la marcha del trabajo;...prácticamente se tardaron dos años en lograr la recuperación de este accidente. A mediados de los setenta y coincidiendo con la transición democrática de España, es cuando se produjeron más cambios en las estructuras organizativas por la creación de nuevos institutos y así, a partir de los Institutos de Biología Celular y del "Gregorio Marañón" se crearon el de Bioquímica de Macromoléculas, y el de Biología del Desarrollo; en tanto que a finales del año 75, con personal procedente de los Institutos "Jaime Ferrán" y Biología Celular, se creaba el de Inmunología y Biología Microbiana. A principios del 77, el CSIC se convertía en un sólo organismo autónomo y a mediados de este mismo año, se sustituía la Junta Rectora del CIB por la Junta de Directores. En el año 79, el Departamento de Biofísica se integra en el Instituto "Ramón y Cajal" como Unidad de Neuropsicofarmacología.

También, en cuanto a otras modificaciones estructurales experimentadas en el centro, habrá de tenerse en cuenta que en el primer tercio de los años ochenta, por reorganización de los efectivos personales del CSIC, se suprimió la organización estructural por institutos y el Centro de Investigaciones Biológicas quedó organizado como un centro multidisciplinar aunque sin alterar los departamentos, secciones o grupos de trabajo; de este modo, se pensó en facilitar el enriquecimien-

to de cada uno de los grupos dedicados a las muy diferentes líneas de investigación que siempre han sido libres, dinámicas y abiertas a muy distintas fronteras de la Ciencia. Aquello no afectó a la productividad ni al entusiasmo del personal cuyas publicaciones, seminarios, cursos, etc. mostraban un incremento imparable en cantidad y calidad científica. Asimismo, el personal auxiliar fue adecuándose cada vez más a las nuevas técnicas y mejorando su formación hasta convertirse en el valioso núcleo profesional con que hoy se cuenta. Otro importante avance se consiguió entre los años 1987 y 1991 en los que el Gobierno decidió impulsar la investigación y el desarrollo tecnológico. Así, poco a poco, el centro fue convirtiéndose en uno de los mejor dotados del país. El entusiasmo mantenido desde la época inicial fue adecuándose a la necesaria profesionalidad y permitió llegar felizmente a los Planes Nacionales de Investigación en los que, entre todos, se procuró una eficaz colaboración que hiciera posible afrontar la consecución de grandes objetivos de carácter pluridisciplinar y apriorísticamente establecidos; en su caleidoscópica imagen se asociaron investigaciones tanto de genética y virología como de endocrinología e inmunología o de otras especialidades.

Al superar en más de diez veces las previsiones de personal científico y auxiliar a albergar en el CIB de Velázquez, su crecimiento hubo de proyectarse hacia el exterior y así, lo que en principio fueron departamentos dieron lugar a nuevos centros de excelencia como el de Biología Celular "Severo Ochoa", el Centro Nacional de Biotecnología y el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"; los tres en relación con la Universidad Autónoma de Madrid, mientras que otros vieron su origen en otras provincias como el Instituto de Microbiología y Bioquímica de Salamanca y el Instituto de Biología Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla. Esta falta de espacio hizo que el Instituto de Genética y Antropología se desplazara a uno de los edificios de la calle Serrano y también que se edificara un nuevo Instituto "Ramón y Cajal";siempre la escasez de espacio y las dificultades económicas han obligado a poner en juego los continuos esfuerzos del personal.

Este tan extraordinario desarrollo, hecho posible gracias al entusiasmo, dedicación y esfuerzo del personal del CIB, obliga a recordar a compañeros que estuvieron en aquellos tiem-

pos difíciles, cuyo talante y valía científica tanto aportaron al engrandecimiento y expansión del Centro. Desdichadamente su prematura marcha de este mundo no les permitirá disfrutar con todos nosotros de la inauguración de un nuevo edificio. Por ello, recordamos aquí a José Avelino Pérez Geijo, auténtico mago de las finanzas que en momentos acuciantes podía proporcionar algún respiro económico; a Angel Pellicer del Departamento de Genética; a Jesús Morales y Carlos Ramírez, siempre atraídos por los hongos filamentosos; a Maximiano Rodríguez buscando aplicaciones a una biomasa de algas verdes; a Carlos Asensio, excelente bioquímico investigando metabolismos enzimáticos y de quien pocos sabían de su habilidad como escultor en los ratos de ocio. Del mismo modo son merecedores de nuestro cariñoso recuerdo, sobre todo por las escuelas de investigación que han dejado: David Vázquez, para quien los mecanismos de antibiosis tenían una atracción particular; Alberto Sols, impulsor de la Enzimología en España y Eladio Viñuelas, destacado científico en Biología Molecular y que tanto aportó al conocimiento de los virus. Los tres eran muy valorados y respetados en los ambientes científicos internacionales.

En esta ocasión, parece obligado mencionar cómo se fueron creando los distintos servicios de apoyo a la investigación, así como su crecimiento evolutivo a medida que iban surgiendo las necesidades. Pese al acentuado protagonismo que en su día se dio a la "torre" para alojamiento de animalarios, es posible que sea este servicio uno de los que, a lo largo del tiempo, haya sufrido más cambios en el CIB tanto en su capacidad, ubicación, y perfeccionamiento como en su dotación en especies animales muy particulares, lo que en la actualidad le convierte en un servicio plenamente moderno.

Así mismo, una muy especial mención merece la existencia del Taller de Instrumentación creado hace una treintena de años que, en principio atendía a los servicios de mecánica y electricidad para, enseguida, ampliarse con los servicios de electrónica y plásticos, así como los de fotografía y delineación. Su desarrollo "*in crescendo*" permite considerar a estos servicios como una estructura modélica de eficaz apoyo a la investigación, ya que además de atender a un buen mantenimiento de los delicados aparatos en uso, tienen capacidad para fabricar otros de particular interés para los investigado-

res. Dicho departamento técnico se completa con laboratorios de moderna tecnología para estudios de microscopía electrónica y confocal, química de proteínas, citometría de flujo, secuenciación de ácidos nucleicos, etc.

No quiero terminar mi entrañable recuerdo sin citar aquí, además de los importantes Servicios de Administración y Almacén, las mejoras y cambios beneficiosos en la organización del Servicio de Biblioteca, tan eficazmente llevados a cabo por su personal, y, por último, este repaso no quedaría completo sin recordar también a un Servicio, organizado desde el principio, considerado más modesto y que pocas veces se menciona, como es el de Comedor; ello no obstante, destacaremos que su hogareña cocina siempre hizo "sentirse como en casa" a todo el personal y ahorrar preciosos intervalos de tiempo para estudio o para llevar a cabo tediosas técnicas de larga duración.

Pese a tan perfecta organización, la crítica situación de falta de espacio llegó a extremos tales que, hace una quincena de años, bajo el impulso del entonces Director José Gómez Acebo, otro de los compañeros prematuramente fallecidos, las autoridades del CSIC se plantearon la necesidad de construir un nuevo CIB en algún lugar de la zona NO de Madrid. Así decidieron que aquel esbelto edificio en "uve", de amplias ventanas y peripatéticos pasillos cuyas luces pronto serían obsoletas por grandes aparatos, habría que sustituirlo por otro, más moderno, sobrio, funcional y con mayor capacidad, que hoy ya es una realidad en la Ciudad Universitaria, próximo a las tres Facultades de Ciencias, de Medicina y de Farmacia; lo que permite una más fácil comunicación entre los grupos de investigadores en el Campus. Hoy, este edificio, está próximo a entrar en funcionamiento coincidiendo con el inicio del nuevo milenio como si de un feliz augurio se tratara mirando al exitoso futuro que no dudamos le acompañará. Es cierto sin embargo, que en el cultivo de la Ciencia no basta con disponer de buenos edificios, sino que se requiere un trato especial de los poderes públicos y todavía el porcentaje del PIB destinado a la investigación en España no alcanza al valor medio de la cifra que se destina en Europa. Cabe esperar que la creación del nuevo Ministerio de Ciencia y Tecnología logre salvar esta situación y solucionar, también, el urgente problema de la incorporación de científicos porque,

pese a lo conseguido hasta ahora y con la mirada puesta en el siglo XXI, es preciso superar esta situación dando un nuevo salto cualitativo y cuantitativo en potencial humano, equipamiento y organización que mejore aún más su buen hacer científico. Esto hará posible una rápida incorporación a aquellos países europeos más adelantados en investigación científica y tecnológica.

Me gustaría tener posibilidades para dibujar, en tiempo de futuro, este nuevo CIB a punto de inaugurarse, ya que estoy seguro de sus éxitos, a juzgar, al menos, por lo que conozco de algunas investigaciones que llevan a cabo actualmente los que otrora, jóvenes becarios, eran mis compañeros de trabajo en temas de genética microbiana y también de aquellos con los que más tarde estudiábamos problemas relativos a la regulación de la respuesta inmune. Hoy, éstos, ya maduros investigadores, dirigen grupos que trabajan en temas que miran hacia los recientes campos científicos de la genómica y proteómica. A ellos y al resto de los investigadores de la casa y de los que me considero un antiguo compañero, me permito ofrecer una tribuna en la Real Academia de Farmacia donde comunicar sus más recientes descubrimientos y publicaciones, en la seguridad de que serán muy bien acogidos.

En esta, supongo, última memoria de actividades del "anciano" CIB a punto de jubilarse, hago votos por los sobresalientes éxitos del recién nacido Centro de Investigaciones Biológicas en el que estoy seguro que las nuevas corrientes científicas de bioinformática, genómica y proteómica tendrán un amplio desarrollo con vistas a solucionar los nuevos retos y objetivos planteados por la investigación biológica.

MEMORIES OF THE CIB

THE CENTER OF BIOLOGICAL SCIENCES ALONG THE TIME

Antonio Portolés

*The applied science do not exist,
only exist applications of sciences.*

Louis Pasteur

More than half a century has passed since The Spanish Research Council asked the architect Miguel Fisac the project of construction of a new building to hold several of the research institutes, then dispersed at Madrid. I think that is worth noting to pay attention on its significance for the Spanish Science. Thus, I cannot avoid that the opening of a new Centre for Biological Sciences bring me remembrances about the old building at Velázquez street, then a boulevard, at Madrid, with the fountain in which "the man attempts to stop with his knowledge the flow of life that escapes" and with the other small mice fountain destroyed by nightly predators.

When our old Centre was begun to be built, I was a young post doctoral fellow at the "Jaime Ferrán" institute that in the company of other laboratory fellows with the head of the laboratory Dr. Socías used to go to see how were growing the new laboratories where we will be placed. At that time we were working at the "Torres Quevedo" institute, the Histology institute "Ramón y Cajal" was at its old building at the Retiro garden and the rest of the of the research institutes were distributed at different university faculties.

At the beginning, only the Ferrán and Cajal institutes were going to be placed at the new building, with big tower at the angle for breeding centre and operation rooms to be shared for both institutes. However, the weak situation of Science in Spain and the political pressure of the distinct "researchers tribes" lead the authorities to modify the initial planning. New laboratories building included reducing the animal breeding and operation rooms facilities....Can you imagine relevant scientific personalities such as Marañón, Sanz Ibañez, Socías, Burriel, Rodríguez Candela, Castro, Carrato or Arteta justifying their scientific needs to get a laboratory along the corridors, floors etc?. The "window module" that avoided so many arguing was still unknown.

In this way began to walk our Centre with a few scientific groups that with time would become the first nucleus of professional research in Spain after the Civil War. Their live competitive spirit developed different research lines depending on the ability of each group on getting funds from different institutions or industries.

Although according to Shakespeare "Time brings a saddlebag on his back for the alms recovered for the oblivion" those who belong to the times of the beginning of the center remember the difficulties and lacks that we suffer until the end of the sixties for getting the necessary equipment to do our research. When I became the director of the centre at the middle of the seventies I was able to assess the efforts and sacrifices carried out by the different groups to maintain scientific relations with foreign groups better financed. The activity of the researchers to attract young students, thanks to the "Formation of scientific personnel plans", and the return of young scientist formed at reputed foreign laboratories, gave as a result the creation of new departments, such Enzymology, Molecular Biology, Endocrinology or new institutes like Cell Biology and the department of Genetics.

The decade of the seventies was full of changes and accidents. Thus, at June 1973 it was necessary to overcome the difficulties after the explosion, due to underground works, that destroyed part of the building specially the laboratories of the "Jaime Ferrán" institute. Specially our laboratories at the basement for continuous growth of microorganisms. It took more than two years to reconstruct all the affected laboratories. At the middle of the decade and coincident with the political changes in Spain at the end of the dictatorship there were changes at the department structure of the Center. From the institutes of Cell Biology and Gregorio Marañón were created to new institutes Biochemistry of Macromolecules and Developmental Biology and with scientist from Cell Biology and Jaime Ferrán a Immunology

and Molecular Microbiology institute was created. At the beginning of 1977 the Spanish research Council became a single autonomous organism and the CIB. Committee was substituted by the directors committee, at 1979 the Biophysics department integrated as a Neuropharmacology unit at the Ramón y Cajal Institute.

Referring the structural changes at the Centre, it has to be considered that at the first third of the eighties the researchers were reorganised and the old institutes were melted in a single institute with the name of Centre for Biological Research. This institute was multidisciplinary and remained organised in departments, sections and groups devoted to different fields of research that always have enjoyed of freedom at the distinct frontiers of Science. This reorganisation did not affect neither the productivity or the enthusiasm of the research people that showed an increase in the number and quality of scientific seminars and publications. At the same time the technical assistants were incorporating the new techniques and improving their skills. Another important step was the government decision of support the research which provides the Centre with an excellent equipment between 1987 and 1991. In this way the Centre become one of the best research centres in Biology in Spain. The enthusiasm maintained from the initial times was becoming a professional skilfulness able to fulfil the government priorities in which genetics, virology, immunology, endocrinology and other fields melted as an a kaleidoscope.

The increase, by an order of ten of the research personnel established for the centre new institutes were growing with researchers from the CIB. New excellent scientific institutes such The Institute for Biomedical research "Alberto Sols", the Center for Molecular Biology, the Institute of Microbiology at Salamanca or the Institute for Plant Biology and Photosynthesis at Sevilla. The Institute of Genetics and Anthropology moved to another building at Serrano Str and a new building for the "Ramón y Cajal" institute was built.

This extraordinary development was mainly due to the enthusiasm and effort of the CIB researchers and technicians that in those difficult times gave their effort to the improvement of science and the Centre of Biological Sciences. Unfortunately the pass of time do not allow to some of them be present and enjoy the opening of the new building of the Centre. We have to remind here at

Avelino Pérez Geijo, a true magician obtaining funds for the Center in difficult times and always attracting new students with his enthusiasm; Angel Pellicer of the department of Genetics, Jesús Morales and Carlos Ramírez always thinking on fungi, Maximiano Rodríguez on algae biomass or Carlos Asensio, excellent biochemist and sculptor. We have to remind here three excellent scientists that fortunately leave behind good scientific schools : Alberto Sols organiser of the first biochemistry in Spain, David Vázquez devoted to the antibiotics mechanisms and Eladio Viñuela prominent scientist in molecular biology. All of them were members of the "Centro de Investigaciones Biológicas" and internationally well renown.

In this occasion we have to refer the creation of new services supporting research that were appearing according to the needs originated for the new times. The initial protagonist, the breeding centre of the tower, was changing with the addition of new services with transgenic animals at present. The scientific workshop was one excellent achievement of the centre, from mechanical and electrical services was improving their scientific supplies to research with photography, design (now electronic). The development of the functions developed for the old workshop reflects the evolution of the research quality at the CIB giving now a support for the new needs of research with modern services of electron microscopy, CCD, flow cytometry, synthesis and sequencing of proteins and oligonucleotides etc.

I can't finish my references on the centre facilities without a reference to the administration, supplying services as well as the library facility one of the best in Spain in Biology so well attended by its personnel. Last but not least, the dinning room that make feel us like at home during the long stays at the laboratory following the development of an experiment.

In spite of such good organisation structure, the critical situation, due to the lack of laboratories and proposed by the then director José Gómez Acebo, lead the CSIC authorities to construct a new building for the CIB at the "Ciudad Universitaria". A new sober and functional building in the neighbourhood of the faculties of Sciences, Pharmacy and Medicine. Today this building is near to be opened coincident with the new millennium as a promise of splendours scientific future that undoubtedly will come for the CIB. It is certainly true that the culture of science do not

grounds only on excellent buildings but depends on the special treatment of the political power to science development, Spain do not reach half of the amount devoted for the rest of the European countries budget to science. It should be expected that the creation of the new ministry of Science and Technology will help to overcome this situation as well as one of the main problems, the incorporation of new scientists to the science system doing an step forward not only from the quantitative but also from a qualitative point of view. This will allow our incorporation to the more advanced countries in science and technology.

I would like to have the possibility of design the new future of the new centre. I am pretty sure of the coming success, judging, at least for the new research being carried out at present for the former students, now excellent scientists that were my laboratory colleagues at the microbial genetics laboratory as well as with those with we studied the problems of the immune response. Today the head groups working on interesting genomic and proteomic projects. To them and to the rest of the components of the researchers group of this house from which I consider myself as a colleague I offer the Royal Academy of Pharmacy to communicate their interesting results where there will be welcome.

Is this, I suppose, the last memory book of the "Old CIB" close to retirement, I hope that the new born CIB have brilliant results in new fields as bioinformatic, genomics and proteomics that will help to solve new objectives on the biomedical research.

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo

Department of Cell and Developmental Biology

Jefe de Departamento
Department Head

JESÚS DEL MAZO MARTÍNEZ
DORA B. KRIMER SMUNIS (Hasta X-2000)

Profesores de Investigación

CONSUELO DE LA TORRE GARCÍA-QUINTANA

Investigadores Científicos

JOSÉ LUIS DIEZ CORTES
PEDRO ESPONDA FERNÁNDEZ
FLORA DE PABLO DAYILA
LUCAS SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JORGE BERNARDO SCHVARTZMAN BLINDER (DESDE V-1999)

Científicos Titulares

PATRICIO ALLER TRESGUERRAS
JESÚS DEL MAZO MARTÍNEZ
ENRIQUE DE LA ROSA CANO
CLARA GODAY BAYLINA
BEGOÑA GRANADINO GOENECHEA
PABLO HERNÁNDEZ VALENZUELA
DORA B. KRIMER SMUNIS
JAVIER REY CAMPOS
MIGUEL ÁNGEL VIDAL CABALLERO

Personal Técnico

ROSARIO DE ANDRÉS MONTES
ELENA DE BLAS BROTONS
MARGARITA CARRASCOSA CEBRIÁN
MARÍA JOSEFA FERNÁNDEZ-CABRERA BAZÁN
ASCENSIÓN GONZÁLEZ DÍAZ
CRISTINA IGLESIAS GUIASOLA
MERCEDES JIMÉNEZ SARMIENTO (Hasta XII-1999)
JOSÉ LUIS MARCILLA CABANILLAS
M^a LUISA MARTÍNEZ ROBLES
DOLORES MATEOS MOYA
AMELIA PARTEARROYO LACABA
VIRGINIA QUESADA GUERRERO (Hasta X-2000)
M^a PILAR ROBLES GONZÁLEZ

Secretaria

M^a DEL CARMEN PARTEARROYO LACABA

Biología Molecular de los Cromosomas Eucarióticos

Molecular Biology of Eukaryotic Chromosomes

JORGE BERNARDO SCHVARTZMAN BLINDER

Jefe de Grupo / Group Leader

PABLO HERNÁNDEZ VALENZUELA

DORA BEATRIZ KRIMER SMUNIS

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

ALBERTO BENGURIA FILIPPINI (Desde XI-1999)

Investigador Contratado / Research Associate

ALICIA SÁNCHEZ GOROSTIAGA

LETICIA OLAVARRIETA SCAPPINI

RAÚL TORRES TORRES

ANA GARCÍA SACRISTÁN

MARÍA JOSÉ FERNÁNDEZ NESTOSA (Desde X-2000)

B. Predoctorales / Graduate Students

SYLWIA BARANSKA (I-III, 1999)

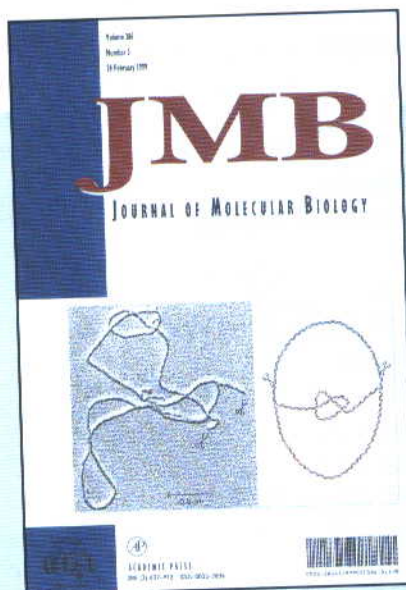
NORA SOBERÓN (III-IX, 2000)

Investigadoras Visitantes / Visiting Scientists

M^a LUISA MARTÍNEZ ROBLES

M^a PILAR ROBLES GONZÁLEZ

Personal Técnico / Technicians



Portada del ejemplar N° 3 del Volumen 286 correspondiente al 26 de Febrero de 1999 de la revista Journal of Molecular Biology, editada por Academic Press. Los editores de la revista eligieron ilustrar la portada de este número con una figura correspondiente a nuestro trabajo (Sogo et al., 1999) en la que se muestra una fotografía al microscopio electrónico de un intermediario de replicación del plásmido pHH5.8 digerido con la enzima de restricción AlwNI (representada por un par de tijeras) conteniendo una burbuja interna anudada. A la derecha, un dibujo interpretativo del plásmido intacto en el que se señalan los sitios de corte de la enzima.

Cover page of the Academic Press' Journal of Molecular Biology, Volume 286, issue # 3 corresponding to February 26, 1999. The Editors of the Journal chose to illustrate the cover of this issue with a figure corresponding to our work (Sogo et al., 1999). The figure shows an electron micrograph of a pHH5.8 replication intermediate containing a knotted bubble after digestion with AlwNI (indicated by a pair of scissors). At the right, a diagram illustrating the intact plasmid and the restriction sites.

Palabras clave: Orígenes y términos de replicación, barreras de replicación, electroforesis bidimensional en geles de agarosa, estereoisómeros, nudos, cromosomas artificiales, virus del papiloma bovino (BPV), virus de Epstein-Barr (EBV), genes rRNA, terminación de transcripción, expansión de repeticiones de trinucleótidos, enfermedades neurodegenerativas, eritroleucemia, hematopoyesis, HMBA, *clk*/*STY*, proteína quinasa, *ran*, expresión génica, diferenciación celular, librerías de cDNA, RDA, microarrays

Iniciación, bloqueo y terminación de la replicación

Desde 1987 nuestro grupo trabaja en la caracterización de la mecánica de la replicación del DNA tanto en sistemas cromosómicos como extra-cromosómicos. Utilizamos plásmidos bacterianos y de levaduras como modelos experimentales sencillos antes de pasar a YACs (cromosomas artificiales de levaduras) y cromosomas de organismos superiores. Nos interesa no sólo la identificación de orígenes, términos y barreras para el progreso de las horquillas, sino también los cambios topológicos que sufre el DNA a medida que progresa la replicación. Creemos que sólo así podremos avanzar en el conocimiento de la estructura y función de los cromosomas eucarióticos. A más largo plazo, nuestro objetivo es la construcción de cromosomas artificiales que puedan ser utilizados como vectores estables para transformar células de plantas y mamíferos, con el objeto de poder realizar una terapia génica eficaz en estos organismos superiores. Hemos observado que en los plásmidos de *Escherichia coli* de pequeño tamaño y con más de un origen de replicación, sólo se activa un origen por plásmido. Además, en aquellos plásmidos con dos orígenes *ColE1* enfrentados, el origen silencioso actúa como una barrera para el progreso de la horquilla iniciada en el otro origen. A lo largo de estos dos últimos años hemos estudiado algunas de las consecuencias de este bloqueo prematuro de la replicación. La acumulación de intermediarios de replicación con una burbuja interna hace que las topoisomerasas de tipo II generen nudos en la región ya replicada del plásmido. La gran mayoría de los cruces de estos nudos son de signo positivo, lo que indica que a lo largo del proceso replicativo, tanto la región no replicada como la ya replicada, están superenrolladas negativamente (Sogo et al., 1999). Hemos observado que este bloqueo de las horquillas no es un evento coyuntural, ya que conduce a la terminación pre-

Keywords: Replication origins and termini, replication fork barriers, two-dimensional agarose gel electrophoresis, stereoisomers, knots, artificial chromosomes, bovine papilloma virus (BPV, Epstein-Barr Virus (EBV), rRNA genes, transcription termination, trinucleotide repeats expansion, neurodegenerative diseases, erythroleukemia, hematopoiesis, HMBA, *clk*/*STY*, protein kinase, *ran*, gene expression, cellular differentiation, cDNA libraries, RDA, microarrays

Initiation, Blockage and Termination of DNA Replication

Our group studies the mechanics of DNA replication in chromosomes and extra-chromosomal elements since 1987. We use bacterial and yeast plasmids as simple experimental systems before moving on to YACs (Yeast Artificial Chromosomes) and the complex chromosomes of higher eukaryotes. Our interest is focused not only in the identification of origins, barriers and termini, but also in the topological changes that occur during DNA replication. In this way we hope to improve our knowledge on the structure and function of eukaryotic chromosomes. Our long-term goal is to build-up artificial chromosomes that might be used as stable vectors to transform plant and mammalian cells. We found that in small *Escherichia coli* plasmids bearing more than one origin, initiation only occurs at one of the origins. Moreover, in those plasmids with two inversely oriented *ColE1* origins, the silenced origin acts as a polar barrier for the fork initiated at the active origin. During the last two years we studied some of the consequences of this premature blockage of DNA replication. Blockage of the replication fork leads to the accumulation of replication intermediates (RIs) containing an internal bubble, which may serve as a substrate for inadvertent knotting events resulting from topo II-type action that tend to fix some of the crossings present in interwound supercoiled molecules. For this reason most of these nodes have positive signs (Sogo et al., 1999). This observation provides the best evidence so far indicating that precatenanes are negatively supercoiled in partially replicated plasmids. We showed that blockage of the replication forks is not just a pause but permanent, since it leads to a premature termination event (Santamaria et al., 2000a). Combination of 2D agarose gel electrophoresis with repeated primer extension by PCR ("Polymerase Chain Reaction") led us to show that the 3' end of the lagging strand at the origin and the

matura de la replicación. La combinación de técnicas como el análisis de intermediarios de replicación por electroforesis bidimensional en geles de agarosa y la extensión repetida de cebadores ("Repeated-Primer-Extension") por PCR ("Polymerase-Chain-Reaction") nos ha permitido comprobar que el extremo 3' de la cadena retrasada del origen y del sitio de bloqueo coinciden exactamente a nivel nucleotídico (Santamaria et al., 2000a). Por otra parte, la preparación de muestras enriquecidas en moléculas específicas parcialmente replicadas, nos ha permitido demostrar por microscopía electrónica, que las burbujas acumuladas son susceptibles de sufrir la reversión de al menos una de las horquillas (Viguera et al., 2000), algo que se había sugerido pero no se había logrado visualizar con anterioridad. Finalmente, hemos demostrado que en plásmidos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con un origen bidireccional, la terminación de la replicación no ocurre siempre en el mismo sitio sino que puede ocurrir en cualquier lugar dependiendo de la sincronía de partida y la velocidad de progresión de las horquillas.

Barreras de replicación del DNA en eucariontes y su relación con las mutaciones dinámicas

Al contrario de lo que se asumió durante mucho tiempo, el movimiento del complejo de replicación a lo largo del DNA no es uniforme, ya que puede encontrarse con obstáculos que inducen el bloqueo o la parada temporal de las horquillas de replicación en sitios específicos. Una horquilla de replicación detenida es una estructura susceptible de recombinar con otras zonas del genoma e inducir mutaciones deletéreas. Estamos estudiando dos de estas barreras para la replicación del DNA: aquellas que de forma natural están presentes en el rDNA y las inducidas por algunas repeticiones trinucleotídicas, cuya expansión constituye la mutación responsable de una serie de enfermedades hereditarias humanas. En cuanto a la barrera del rDNA (denominada RFB), hemos comprobado que está altamente conservada en todos los organismos eucarióticos analizados. Estamos estudiando el mecanismo molecular involucrado, su regulación y su papel biológico. En *Pisum sativum*, los elementos cis de la RFB son una serie de repeticiones en tándem de 27 bp localizadas en el espaciador, cerca del extremo 3' de la unidad transcripcional. Estos elementos no son suficientes para promover el bloqueo de la replicación, ya que además

blocking site coincides precisely at the nucleotide level. Interestingly, RIs containing an internal bubble may undergo reversion of the fork, at least in vitro (Viguera et al., 2000). Fork reversion was hypothesized but never shown before. Finally, we showed that in Saccharomyces cerevisiae plasmids with a bidirectional origin, termination does not occur at a fixed site but may take place anywhere depending on the firing synchrony and the rate of forks progression (Santamaria et al., 2000).

DNA replication arrest in eukaryotes and its relationship with dynamic mutations

*Contrary to what was thought for many years, movement of replication complexes along DNA is not uniform. The replisome may encounter obstacles that could induce pausing or even blockage of the replication fork at specific sites. An arrested replication fork is prone to recombine with other regions of the genome and to induce deleterious mutations. We are currently studying two of these DNA replication fork barriers (RFBs): the natural barrier present in eukaryotic rDNA and the replication arrest induced by trinucleotide tandem repeats. An expansion of some trinucleotide repeats is the mutation responsible for a series of hereditary human diseases. Concerning the rDNA replication fork barrier (RFB), it is highly conserved from yeast to mammals and higher plants. Our objective is to determine the molecular mechanism involved, its regulation and biological role. In *Pisum sativum*, a series of 27-bp imperfect tandem repeats located in the spacer, close to the 3' end of the transcriptional unit, is the cis-acting element of the RFB. These repeats, however, are not sufficient to promote replication arrest. At least one trans-acting nuclear protein that binds the 27-bp repeats in vitro is also required. This requirement explains our previous observation that these 27-bp repeats do not act as an RFB when they replicate in heterologous systems.*

*In vivo studies demonstrated a strong RFB in the rDNA of mouse cells. Cis- and trans-acting factors involved in this barrier are also used by the cell to terminate rRNA transcription by RNA polymerase I. However, in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the mechanism of fork arrest at the rDNA RFB is independent of transcription termination. This suggests that although the rDNA RFB was conserved throughout the evolution of eukaryotes, the molecular mechanism that regulates it diverged. Characterization of the *Schizosaccharomyces**

se requiere, al menos, una proteína de localización nuclear que, en ensayos *in vitro*, se une específicamente a estas repeticiones. El requerimiento de un factor *trans* explica nuestras observaciones de que estas repeticiones de 27 bp no actúan como una barrera cuando replican en sistemas heterólogos.

Estudios *in vivo* realizados en nuestro laboratorio demostraron la presencia de una fuerte RFB en el rDNA de ratón, en la que los factores *cis* y *trans* implicados coinciden con los responsables de la terminación de la transcripción del rRNA por RNA polimerasa I. Sin embargo, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el mecanismo de bloqueo de la replicación es independiente de la terminación de la transcripción. Esto sugiere que aunque la barrera del rDNA se ha conservado a lo largo de la evolución, el mecanismo molecular que la regula ha divergido. Los estudios que estamos realizando en *Schizosaccharomyces pombe* apoyan esta hipótesis, dado que en esta especie, evolutivamente más próxima a mamíferos que a *S. cerevisiae*, coexisten ambos mecanismos. El rDNA de *S. pombe* contiene dos tipos de RFBs, uno dependiente de los factores de terminación de la transcripción y otro, aún por caracterizar, en el que los factores implicados no participan en la terminación de la transcripción.

La estructura secundaria adoptada por algunas secuencias de DNA también pueden ocasionar un bloqueo de la replicación, sin la intervención de factores asociados. Este parece ser el caso del bloqueo inducido por microsátelites trinucleotídicos, cuya expansión constituye la mutación responsable de un elevado número de enfermedades hereditarias humanas. Estamos estudiando la relación causa-efecto entre el bloqueo de la replicación en estas secuencias y su inestabilidad. Hemos observado que en sistemas procarióticos modelo, esta relación es cierta para todos los trinucleótidos asociados a enfermedades. En la actualidad estamos estudiado esta relación en cultivos de células humanas normales y procedentes de individuos afectados por estas enfermedades de expansión de trinucleótidos.

Regulación de la diferenciación inducida en células eritroleucémicas

Las características predominantes de la mayoría de las enfermedades tumorales a nivel celular incluyen una pérdida del control de la proliferación y un bloqueo de la diferenciación

pombe RFB supports this hypothesis. In this species, closer to higher eukaryotes than *S. cerevisiae*, the mechanisms previously described for budding yeast and mammals coexist.

Secondary structure of some DNA sequences can also induce replication arrest per se without the requirement of additional factors. This seems to be the case for some trinucleotide tandem repeats that are expanded in a growing number of hereditary human diseases. We are studying cause-effect relationships between replication fork arrest at these triplet repeats and their instability. We found this relationship occurs in prokaryotic models for all the trinucleotide repeats associated with expansion diseases in humans. We are now studying this relationship in cultured human cells established from normal and affected individuals.

Regulation of induced differentiation in murine erythroleukemia cells

Tumor cells are characterized by a loss of control of cell proliferation and blockage of cell differentiation. In many instances however, cells are able to reinitiate and successfully complete the differentiation program, including the reestablishment of terminal cell division. The main goal of our lab is to understand how oncogenic transformation interferes with mechanisms of regulation and how the normal process can be reconstituted. Our studies are based on the molecular analysis of blockage of differentiation in murine erythroleukemia (MEL) cells.

MEL cells blocked at the proerithroblast stage by the integration of the Friend complex virus, can be induced to reenter their terminal differentiation program by the action of several agents such as HMBA. Our main goal is to identify genes that are activated or repressed during the early steps of cell commitment. Our working hypothesis is that a temporal sequence of changes in expression of certain genes is an essential part of switching tumor cells back into terminal differentiation. Using differential hybridization and subtracted libraries we identified genes whose expression is modulated through MEL induced differentiation. Among those, a) *ran* GTPase and b) protein kinase *clk*/STY are specially relevant for preferential expression in erythropoietic cell lines and possible role in differentiation.

a) *Ran* is an abundant protein that is gradually inactivated throughout MEL cell differentiation, probably due to exit of the cell cycle. Blockage of *ran* however, preferentially affects cells

celular. Existen evidencias que demuestran que las células tumorales son capaces, bajo condiciones apropiadas, de reiniciar y completar su programa de diferenciación, incluyendo el camino hacia la división celular terminal. Desde hace ya varios años, el objetivo de nuestro laboratorio es avanzar en el conocimiento de cómo la transformación oncogénica interfiere con los mecanismos de regulación en células tumorales y cómo estas perturbaciones pueden ser revertidas para reestablecer los controles normales. Nuestro planteamiento se basa en el estudio de las bases moleculares del bloqueo de la diferenciación en células de la eritroleucemia murina y de los cambios que tienen lugar cuando se inducen a las mismas a una diferenciación terminal.

Las células MEL, bloqueadas a nivel de proeritroblastos por integración del complejo vírico Friend, pueden ser inducidas a reiniciar el programa de diferenciación mediante inductores como el HMBA. Nuestro objetivo se centra en la identificación de genes cuya activación (o desactivación) tenga lugar durante las primeras etapas de la determinación celular. Esto se basa en la existencia de cambios temporales y secuenciales en la expresión de genes que estimularían (o reprimirían) el paso de una célula tumoral a una diferenciación terminal. Mediante el empleo de técnicas de hibridación diferencial y librerías de substracción hemos identificado genes cuya expresión se ve modulada a lo largo de la diferenciación inducida de células MEL. Por su expresión preferencial en líneas eritropoyéticas y por su posible participación en el proceso de diferenciación son de especial interés: a) la GTPasa Ran, y b) la proteína quinasa clk/STY.

a) Ran es una proteína abundante en células MEL que se inactiva gradualmente a lo largo de la diferenciación, hecho que está relacionado con la salida de las células del ciclo celular. El bloqueo de ran sin embargo, afecta preferencialmente a células que han iniciado la diferenciación, provocando un aumento de apoptosis en la población diferenciada.

b) Clk/STY es una proteína quinasa de doble acción, capaz de fosforilar residuos de serina/treonina así como de tirosina, que interactúa preferencialmente con las proteínas de la familia SR. Hemos comprobado que clk se activa a lo largo de la diferenciación inducida de células MEL y que la expresión exógena de clk acelera la aparición de células diferenciadas. Utilizando vectores de expresión inducibles por tetraciclina, estamos analizando en qué momento del proceso actúa clk y cuáles son los efectos de un bloqueo en los distintos momentos de la diferenciación.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, PM95-0016 (1996-1999)
- CAM, 08.6/0016/1997 (1998-2000)
- MEC, 1988 (1998-1999)
- PGC, PM97-0138 (1998-2001)
- FIS, 99/0850 (1999-2001)
- PGC, PB98-0484 (2000-2002)
- MEC, 1988 (1998-1999)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **David Santamaría Velilla.** Caracterización del bloqueo y progresión asimétrica de las horquillas de replicación. Universidad Autónoma de Madrid, 1999. Director: Jorge Bernardo Schwartzman Blinder.
- **Natasha Vanegas Gómez.** Estudio de la diferenciación celular inducida por HMBA en células de la eritroleucemia murina Universidad Autónoma de Madrid, 1999. Directora: Dora B. Krimer Smunis.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- López-Estraño, C., Schwartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernández, P. (1999). Characterization of the pea rDNA replication fork barrier: putative cis- and trans-acting factors. *Plant Molecular Biol.* **40**, 99-110.
- Sogo, J.M., Stasiak, A., Martínez-Robles, M.L., Krimer, D.B., Hernández, P., and Schwartzman, J.B. (1999) Formation of knots in partially replicated DNA molecules. *Journal of Molecular Biol.* **286**, 637-643.
- Santamaría, D., Hernández, P., Martínez-Robles, M.L.; Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2000). Premature termination of DNA replication in plasmids carrying two inversely oriented ColE1 origins. *Journal of Molecular Biol.* **300**, 75-82.
- Santamaría, D., Viguera, E., Martínez-Robles, M.L., Hyrien, O., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2000). Bi-directional replication and random termination. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2099-2107.
- Viguera, E., Hernández, P., Krimer, D.B., Lurz, R., and Schwartzman, J.B. (2000). Visualization of plasmid replication intermediates containing reversed forks. *Nucleic Acids Res.* **28**, 498-503.

Reproducción Celular

Cell Reproduction

CONSUELO DE LA TORRE GARCÍA-QUINTANA

Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigadora de Carrera / *Staff Scientist*

GONZALO GIMÉNEZ MARTÍN

Investigador Emérito / *Emeritus Scientist*

ARTURO PIÑA (Desde X-1999 Hasta VI-2000)

JUANA PINCHEIRA (VIII-XII, 2000)

Investigadores Visitantes / *Visiting Scientists*

JUAN FRANCISCO GIMÉNEZ ABIÁN

B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

JESÚS ANGEL CARBALLO GONZÁLEZ-CORROTO (Desde XI-1999)

B. Predoctoral / *Graduate Student*

MARGARITA CARRASCOSA CEBRIÁN

JOSÉ LUIS MARCILLA CABANILLAS

Personal Técnico / *Technicians*



Palabras clave: Ciclo celular, regulación por rutas de chequeo, estructura y función cromosómica, daño y reparación del DNA, células eucarióticas

Keywords: Cell cycle, regulation by checkpoints, chromosome structure and function, DNA damage and repair, eukaryotic cells

Regulación del ciclo celular por rutas de chequeo

La regulación del ciclo celular por retroalimentación está a cargo de los llamados genes de chequeo, o supresores tumorales en mamíferos. Ellos permiten retrasar cualquier transición irreversible entre dos fases secuenciales del ciclo celular, proporcionando así a la célula un tiempo adicional para completar un requisito. Los bloqueos del ciclo por chequeo son, pues, reversibles. Además, dichos bloqueos tienen caducidad: si no se cumple el requisito en un cierto tiempo, la célula acaba realizando la transición (adaptación). Las consecuencias de dicha adaptación en rutas que controlan la idoneidad del DNA llevan a inestabilidad génica y/o aneuploidías. La cafeína, inhibidor de las quinasas ATM (mutada en pacientes con ataxia-telangiectasia) y ATR (relacionada con ella) potencia la cancelación de múltiples rutas de chequeo, al ser dichas quinasas componentes de ellas.

Hemos determinado que la hidroxiurea, al producir una

Cell cycle regulation by checkpoint pathways

The feedback regulation of cell proliferation is under the control of checkpoint genes, known as tumor suppressor in mammalian cells. They delay irreversible transitions between two sequential cycle phases, providing the cell with an additional time to fulfill certain requirements. Checkpoint-induced blocks are then reversible. They are also frail, as if the requirement is not fulfilled after a time, the cell will enter into the next cycle phase in spite of its inability to deal with later processes. This undue override, known as checkpoint adaptation, is serious when the checkpoint is activated by failures in the DNA, as adaptation is the source of genome instability and/or aneuploidy. Caffeine, a drug that inhibits the ATM kinase (mutated in ataxia-telangiectasia patients) and the related ATR kinase, promotes the override of multiple checkpoint blocks, because both kinases are components of the signal transduction segment of the checkpoint pathways.

We have found that hydroxyurea, an inhibitor of the ribonu-

depleción de nucleótidos por inhibición de la ribonucleótido reductasa, activa en las células vegetales dos rutas de chequeo que interrumpen la replicación al comienzo y en el centro del periodo S. La superación indebida por caducidad de ambos bloqueos no impidió que las células iniciaran y cursaran su periodo G2, ni que -dentro del G2- se enfrentaran con los chequeos de terminación de replicación y de reparación del DNA antes de permitirse la iniciación de mitosis. La cafeína fue incapaz de favorecer la adaptación de los bloqueos por chequeo en el periodo S, aunque sí el de daño al DNA en G2. Esa eficacia era independiente de la historia previa de la célula y del inductor del chequeo, ya que también era inducida por metales pesados. La relación entre cantidad de daño oxidativo y chequeo G2 se abordó también en pacientes con síndrome de Down y anemia de Fanconi, que siempre presentan un daño cromosómico mayor que los controles. El empleo de cafeína también favorecía en ellos la adaptación al chequeo G2, mientras que un antioxidante rebajó el daño cromosómico.

En cuanto a la posible regulación por chequeo de otros procesos del ciclo cromosómico, hemos definido, por primera vez, que la capacidad para ensamblar ejes cromosómicos previa inducción de condensación cromosómica prematura en células cultivadas de mamíferos (*M. mus musculus*), cuyos ejes fueron teñidos por plata, se pierde transitoria y localmente durante la replicación (figura), para ganarse de nuevo poco después del paso de la horquilla de replicación. Más aún, pudimos determinar que la individualización premitótica del cromosoma depende de la actividad de la topoisomerasa II, y que dicha actividad se encuentra bajo un control por chequeo en G2. Su superación indebida permitió observar estructuras cromosómicas (figuras omega) que representan zonas de anudamiento entre regiones no homólogas, por ello no relacionadas con la replicación semi-conservativa, sino con un proceso de anudamiento casual, cuya resolución va seguida de recombinación en G2.

cleotide reductase that produces depletion of nucleotides, activates two sequential checkpoint pathways, one in early and the other in mid S. The undue override of one or both replication checkpoints did not prevent the initiation and completion of the ensuing G2. Their entry into mitosis did not take place before their confrontation with the DNA completion and DNA damage checkpoints in G2. It was found that caffeine did not favour the undue override of the S checkpoint, while it was efficient in the override of the DNA damage checkpoint in G2. Caffeine effect was independent from the previous cell history and from the inducer of DNA damage, as it also responds to heavy metals. The relationship between oxidative DNA damage and override of the G2 checkpoint was also tackled with in patients that displayed increased basal damage in relation to controls (Down syndrome and Fanconi's anemia). The use of an antioxidant decreased the chromosomal damage reaching mitosis, while caffeine override of the G2 checkpoint increased such a damage.

In relation to the chromosomal cycle in interphase we found, after the induction of premature chromosome condensation in mammalian cells (M. Muntak) (figure) how the competence to assemble the non-histone chromosomal axis or scaffold is transiently and locally lost during the passage of the DNA throughout the replicosome, and it is regained shortly afterwards. We have also found that the process of chromosomal individualization that takes place in G2 depends on topoisomerase II activity. Moreover, this activity was under a checkpoint control. Its undue override allowed to observe the formation of omega figures in their chromosomal cores. They seem to represent places of random non-replicative entangles formed between non-homologous sequences, resolved in G2 itself.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB96-0909 (1997-1999)
- Convenio CSIC-U. de Chile, 99-CL-009 (1999-2000)
- UE, BIOTECH-RTD PL96-0275 (1996-2000)
- A. Integrada Austria-España, HU-1997-33 (1998-1999)
- CAM, BOCM 16/5/97 (renovación) (1999-2000)
- CAM, BOCM 28/1/2000 (2000-2002)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Giménez-Abián, J.F., Clarke, D.J., De la Torre, C., Mullinger, A.M., Giménez-Martín, G., Downes, C.S., and Johnson, R.T. (1999). Competence for assembly of chromatid cores is progressively acquired during S phase in mammalian cells. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 601-603.
- Pincheira, J., Navarrete, M.H., De la Torre, C., Tapia, G., and Santos, M.J. (1999). Effect of vitamin E on chromosomal aberrations in lymphocytes from patients with Down's syndrome. *Clinical Genet.* 55, 192-197.
- Acevedo, R., Moreno Díaz de la Espina, S., Fernández-Gómez, M.E., Cuadrado, A., Jouve, N., and De la Torre, C. (2000). Dormancy and onset of proliferation in three *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids differing in the number of the introgressed *S. spontaneum* chromosomes. *J. Exp. Bot.* 52, 1-6.
- Borboa, L., and De la Torre, C. (2000). Adaptation to Cd(II) and Zn(II) and the caffeine-potentiated override of the G2 block induced by the checkpoint activated by DNA damage. *Plant Biosystems (former J. Bot. Ital.)* 134, 3-9.
- Pelayo, H.R., Lastres, P., and De la Torre, C. (2000). Replication and G2 checkpoints: their response to caffeine. *Planta* 212, 444-445.
- Pincheira, J., Bravo, M., Santos, M.J., De la Torre, C., and López-Sáez, J.F. (2000). Fanconi's anemia lymphocytes: effect of DL-alpha tocopherol (Vitamin E) on chromatid breaks and on G2 repair efficiency. *Mutation Res.* 461, 265-271.

Estrés y Muerte Celular

Cell Stress and Cell Death

Patricio Aller Tresguerres
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

Nuria E. Vilaboa Díaz (Hasta XII-1999)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

Carlos Fernández Sáez (Desde I-2000)
María del Alba Galán García
Alfonso Troyano Díaz
B. Predoctorales / Graduate Students

Elena de Blas Brotons
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Apoptosis, necrosis, proteínas de estrés, drogas antitumorales, células monocíticas

Keywords: Apoptosis, necrosis, stress proteins, antitumour drugs, monocytic cells

Inducción de apoptosis y necrosis por drogas antitumorales específicas del DNA

Induction of apoptosis and necrosis by DNA antitumour drugs

El tratamiento de las leucemias y otros tumores requiere frecuentemente el uso de agentes citotóxicos/citostáticos específicos del DNA. Ello incluye la hidroxiurea y la citarabina (ara C); agentes alquilantes, tales como el cisplatino y el melfalán; inhibidores de la DNA topoisomerasa II, tales como los agentes intercalantes amsacrino (mAMSA), mitoxantrona y doxorubicina (adriamicina), y los no intercalantes etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26); y, todavía bajo ensayo clínico, algunos derivados de la camptotecina, inhibidor de la DNA topoisomerasa I. Hemos demostrado que el tratamiento in vitro con bajas concentraciones de estos agentes induce a largo término (72-96 h) la diferenciación y muerte por apoptosis de células leucémicas mieloides, fenómenos asociados a alteraciones específicas en el ciclo de división celular (parada

The treatment of leukemia and other types of cancer frequently requires the use of DNA-specific cytotoxic/cytostatic drugs. This includes DNA synthesis inhibitors, such as hydroxyurea and cytarabine; alkylating drugs, such as cisplatin and melphalan; DNA topoisomerase II inhibitors, such as amsacrine (mAMSA), mitoxantrone, doxorubicin (adriamycin), etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26); and some analogs of camptothecin, a DNA topoisomerase I inhibitor. We earlier demonstrated that prolonged in vitro treatments (72-96 h) with low concentrations of these drugs induce differentiation and death by apoptosis of myeloid leukemia cells, in association with specific alterations of the cell cycle (S and/or G2 arrest and unbalanced cell growth). By contrast, high concentrations of the drugs rapidly cause apoptosis by mechanisms not directly related with the cell cycle. Nevertheless, some cytotoxic treatments may cause

en fases S y/o G2 e hipertrofia celular). Por el contrario, a concentraciones elevadas dichos agentes inducen rápidamente apoptosis por mecanismos no estrictamente dependientes del ciclo de división. No obstante, algunos agentes citotóxicos pueden provocar no sólo apoptosis, sino también necrosis, dependiendo del tipo celular y de las circunstancias experimentales - p.e., alterando el contenido en glutatión (GSH) intracelular, según hemos demostrado recientemente (Galán et al.: Eur. J. Cell. Biol., en prensa). Esta distinción es importante con vistas a la optimización de las terapias antitumorales, dado que la muerte apoptótica es claramente preferible para el organismo al evitar la libre diseminación de residuos celulares y el daño subsiguiente de los tejidos circundantes (p.e., inflamación).

Nuestro trabajo actual se centra en el análisis de distintos factores que pueden regular la generación de apoptosis, y decidir la selección del tipo de muerte celular (apoptótica-necrótica), tras tratamiento con las drogas antitumorales arriba indicadas. Utilizando especialmente células del linaje monocítico-macrofágico - humanas (U-937 y THP-1) y de ratón (RAW) - estamos estudiando: (a) La capacidad de los agentes antitumorales, bajo distintas condiciones experimentales, para provocar apoptosis y necrosis. (b) La regulación de ambos tipos de muerte por estrés oxidativo. Para ello analizamos la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la modulación de la apoptosis y necrosis por agentes antioxidantes con distinta especificidad. (c) La regulación de la muerte celular por otros factores dependientes de oxidación, tales como: (i) alteración en los niveles de ATP; (ii) disfunción mitocondrial; y (iii) actividades caspasas y alteraciones en sus vías de activación (p.e., liberación de citocromo C). (d) La implicación de proteína quinasas - en particular las MAP quinasas p38 y ERK1/2, y la PKC delta - y de factores de transcripción críticos - especialmente Jun/AP-1 y NF- κ B - en la inducción de apoptosis y la selección entre apoptosis y necrosis.

Regulación de la respuesta de estrés: Expresión de proteínas de choque térmico (HSPs) y resistencia celular

Una propiedad de algunos agentes físico químicos (tales como la hipertermia, los metales pesados, y algunos inhibidores del metabolismo energético) es su capacidad de activar

apoptosis or necrosis, depending on the cell type and the experimental conditions - e.g., alterations in the intracellular glutathione (GSH) content, as recently demonstrated (Galán et al.: Eur. J. Cell. Biol., in press). Apoptosis seems to be clearly advantageous for the organism, since this mode of death prevents the free dissemination of cell debris and the consequent damage of the surrounding tissue, as it occurs during necrosis.

Our present research consists in the investigation of factors possibly involved in the regulation of apoptosis and in the selection between apoptosis and necrosis in monocyte-macrophage cells (U-937 human promonocytic cells and RAW mouse macrophages) treated with the above indicated antitumour drugs. In particular, we are studying: (a) The capacity of the antitumour agents, under different experimental conditions, to cause apoptosis and necrosis. (b) The regulation of both types of death by oxidative stress. With this aim, we analyze the generation of reactive oxygen species (ROS), and the modulation of apoptosis and necrosis by antioxidant agents. (c) The regulation of cell death by oxidation-dependent factors, such as (i) alterations in intracellular ATP levels; (ii) mitochondrial dysfunction; and (iii) caspases and their mechanisms of activation (e.g., cytochrome C release). (d) The involvement of protein kinases - in particular the p38 and ERK1/2 MAP kinases and PKC delta - and critical transcription factors - Jun/AP-1 and NF- κ B - in both apoptosis and necrosis induction.

Regulation of the stress response: Expression of heat-shock proteins (HSPs) and cell resistance

A well known property of some physical and chemical agents (such as heat, heavy metals and inhibitors of energy metabolism) is the capacity to induce the stress response, characterized by the synthesis and accumulation of heat-shock proteins (HSPs). The stimulation of HSP gene expression by stress inducers in higher eukaryotes seems to be specifically regulated by heat-shock factor 1 (HSF1). Thus, under stressful conditions, HSF1 (present in the cytoplasm as a monomer of forming heteromeric complexes) undergoes homotrimerization, translocation to the nucleus, binding to its DNA recognizing sequence (the heat-shock element, or HSE), and finally hyperphosphorylation to fully acquire the transactivation capacity. The expression of HSPs is now considered as a subject of great clinical-pharmacological interest, due to the capacity of HSPs to confer resistance against apoptosis.

la respuesta de estrés, caracterizada a nivel molecular por la síntesis y acumulación de "proteínas de choque térmico", o HSPs. La inducción de los genes HSP por estrés en células eucarióticas superiores está regulada por el factor transcripcional HSF1 ("heat-shock factor 1"), siguiendo un proceso que comprende su liberación de un complejo represor en el citoplasma, homotrimerización, translocación al núcleo, unión a la secuencia consenso de reconocimiento en el DNA (HSE, o "heat-shock element"), y finalmente hiperfosforilación para adquirir la plena actividad transactivadora. Aunque contemplado inicialmente como un tema de interés casi exclusivamente académico, la expresión de las HSPs ha adquirido recientemente interés clínico-farmacológico, dada la evidencia de que algunas de estas proteínas inhiben el proceso de apoptosis. Por ello, se sospecha con fundamento que la expresión constitutiva de HSPs en algunos tipos tumorales (p.e., HSP70 en cáncer mamario) puede haber contribuido al desarrollo del fenotipo tumoral. Además, la sobreexpresión de HSPs, sea constitutiva o inducida por fármacos, podría limitar seriamente la eficacia de la terapia antitumoral. Finalmente, hay otros genes de gran importancia fisiológica distintos a los clásicos HSPs que también son regulables por HSF1 - p.e., el gen MDR1/P-gp, responsable principal del fenotipo de resistencia múltiple a drogas.

Nuestro trabajo actual consiste en el análisis de factores posiblemente implicados en la regulación de la respuesta de estrés, y en el estudio de la relación entre expresión de HSPs y la muerte celular (apoptótica y necrótica). Como modelos celulares utilizamos células promonocíticas humanas U-937 y macrofágicas de ratón RAW, y como inductores de estrés utilizamos normalmente el choque térmico y el metal pesado cadmio. Continuando nuestro trabajo ya iniciado (Galán et al., *Biochim. Biophys. Acta* [en prensa]), estamos estudiando: (a) La dependencia de la respuesta de estrés respecto de la oxidación celular. Ello se lleva a cabo midiendo la generación de especies reactivas de oxígeno, y analizando el efecto de distintos agentes antioxidantes sobre la expresión de los genes HSP (a nivel de RNA y proteína) y sobre los distintos pasos de la activación de HSF1 (oligomerización, unión al DNA, y fosforilación). (b) La implicación de MAP quinasas - JNK, p38 y ERK 1/2 - y de la PKC delta en la fosforilación-activación de HSF1. (c) Además, estamos analizando la capacidad de agentes antitumorales con distinto mecanismo de acción para

Because of this property, the constitutive overexpression of HSPs in some tumours (e.g., HSP70 in breast cancer cells) may be determinant for the development of the malignant phenotype. Moreover, the increased expression of some HSPs, either constitutive or induced by antitumour drugs, may severely compromise the efficacy of the antitumour therapy. Finally, some genes of great physiological importance other than the classical HSP genes are also regulated by HSF1 - e.g., the MDR1/P-gp gene, the main determinant of the multidrug resistance phenotype.

*Our present interest is focussed on the analysis of some factors possibly involved in the regulation of the stress response, as well as on the relationship between HSP expression and cell death (apoptotic and necrotic). The cell models used are U-937 human promonocytic cells and mouse RAW macrophages, and the stress inducers used are heat-shock and the heavy metal cadmium. Following our already initiated studies (Galán et al., *Biochim. Biophys. Acta*, in press), the following aspects are under investigation: (a) The regulation of the stress response by intracellular oxidation. This aspect is analyzed by measuring the generation of reactive oxygen species, as well as by determining the effect of antioxidant agents on HSP expression (at both the RNA and protein levels) and on HSF1 activation (oligomerization, DNA binding, and phosphorylation). (b) The involvement of MAP kinases - JNK, p38 and ERK1/2 - and PKC delta on HSF1 phosphorylation-activation. (c) In addition, we are analyzing the capacity of antitumour drugs to induce the stress response. In all cases (a-c), the possible alterations in HSP expression (specially HSP70 and HSP27) is correlated with changes in the cell susceptibility to apoptosis and necrosis.*

inducir la respuesta de estrés. En todos los casos (a-c) intentamos correlacionar los posibles cambios en la expresión de las HSPs (especialmente HSP70 y HSP27) con alteraciones en la susceptibilidad celular a la apoptosis y necrosis.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, 08.1/0027/1997 (1998-2000)
- DGEIC, PM97-0144 (1998-2001)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **María del Alba Galán García.** Regulación del proceso de muerte celular (apoptosis) en células leucémicas por agentes antineoplásicos y tratamientos de estrés. Universidad de Alcalá, 2000. Director: Patricio Aller.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Galán, A., García Bermejo, L., Vilaboa, N.E., De Blas, E., and Aller, P. (2000). Uncoupling of apoptosis and Jun/AP-1 activity in human promonocytic cells treated with DNA-damaging and stress-inducing agents. *Eur. J. Cell. Biol.* 7, 1-9.
- Galán, A., García-Bermejo, M.L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., De Blas, E., Kazanietz, M.G., and Aller, P. (2000). Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J. Biol. Chem.* 275, 11418-11424.
- Miguel, B.G., Calcerrada, M.C., Mata, F., Aller, P., Clemente, R., Catalán, R.E., and Martínez, A.M. (2000). Differential redistribution of protein kinase C isoforms by cyclic AMP in HL60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 596-602.
- Torres, R., Calle, C., Aller, P., and Mata, F. (2000). Etoposide stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D3 differentiation activity, hormone binding and hormone receptor expression in HL-60 human promyelocytic cells. *Mol. Cell. Biochem.* 208, 157-162.
- Vilaboa, N.E., Galán, A., Troyano, A., De Blas, E., and Aller, P. (2000). Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *J. Biol. Chem.* 275, 24970-24976.

Regulación de Expresión de Genes Eucariotas

Eukaryotic Gene Expression

MIGUEL ANGEL VIDAL CABALLERO
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

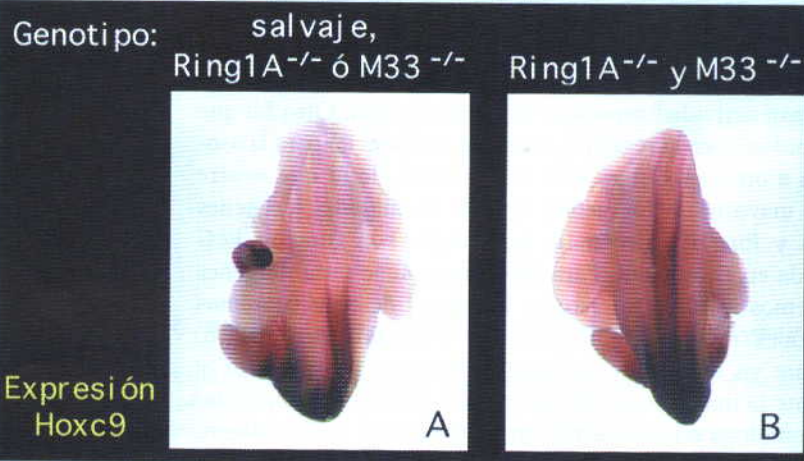
LUCÍA CALLEJA (Desde II-2000)
CAMELIA MARCOS GUTIÉRREZ (Hasta VIII-1999)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

EMILIANO GARCÍA PIZARRO
M. MAR LORENTE PÉREZ
B. predoctorales / *Graduate Students*



Derepresión de genes Hox en embriones de ratón con mutaciones en los genes Polycomb M33 y Ring1A. Se muestran embriones de ratón de 11.5 de desarrollo hibridados in toto a mRNA antisentido de Hoxc9. Los embriones deficientes en Ring1A y en M33 (B) muestran expresión de Hoxc9 en estructuras anteriores de neuroectodermo y mesodermo en las que en embriones salvajes o deficientes para uno sólo de los dos genes (A) no hay expresión.

Synergistic interactions between the murine Polycomb group genes Ring1A and M33. Whole mount in situ hybridization of 11.5 dpc mouse embryos to antisense Hoxc9 mRNA. The comparison of the expression patterns showed an anteriorization of the rostral boundary of Hoxc9 expression in embryos lacking both Ring1A and M33 (B) compared to that of wild type embryos or embryos lacking either Ring1A or M33 (A).



Palabras clave: Genes Polycomb, Ring1, RYBP, ratones transgénicos, ratones knock-out

Nuestro laboratorio estudia los mecanismos de silenciamiento en vertebrados mediados por proteínas del grupo Polycomb (PcG). Estos mecanismos son especialmente relevantes en el mantenimiento de estados transcripcionales inactivos. Mutaciones en genes que codifican proteínas PcG producen alteraciones de los procesos de desarrollo, así como de la actividad proliferativa de una variedad de tipos celulares.

Clonaje molecular y caracterización funcional de genes del grupo Polycomb de ratón

En la actualidad, gran parte del estudio de la función PcG deriva de la experimentación en la mosca *Drosophila melanogaster*. Los productos de los genes PcG forman complejos que participan, mediante un mecanismo(s) molecular(es) no caracterizado en la represión transcripcional de un número de genes relevantes en desarrollo, y en particular de los genes Hox. El sistema de represión transcripcional PcG está conservado evolutivamente, aunque el conocimiento de la función PcG en mamíferos es muy limitado. En el laboratorio hemos identificado dos nuevas proteínas de ratón, Ring1A y Ring1B, que muestran bloques de homología a lo largo de sus secuencias, aunque son codificadas por genes diferentes. Estas proteínas contienen un motivo RING finger, implicado en la asociación a proteínas PcG y que forma parte de la región N-terminal con actividad represora de transcripción. Otro bloque de homología, en la región C-terminal, es esencial para la asociación a otras proteínas PcG. A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los genes PcG de mamíferos, los genes Ring1A y Ring1B carecen de homólogos con función PcG conocida en *Drosophila*. Para determinar si se trata de genes PcG hemos iniciado un estudio funcional de estas proteínas en ratones mutantes con ganancia y pérdida de función, mediante su expresión ectópica en ratones transgénicos y mediante la inactivación de uno de los genes por recombinación homóloga en células ES (en colaboración con T. Magin, Bonn), respectivamente. La caracterización de estos animales muestra transformaciones homeóticas y otras alteraciones del esqueleto axial comparables a las de ratones con mutaciones en genes PcG. El estudio de los patrones de expresión en la

Keywords: Polycomb genes, Ring1 proteins, repression, transgenic mice

Our laboratory is interested in the transcriptional silencing mediated by the Polycomb group of genes (Pc-G) in vertebrates. This function is specially relevant for the maintenance of the transcriptionally inactive state. Pc-G mutations result in alterations of developmental processes, as well as of the normal proliferation of a number of cell types.

Molecular cloning and functional characterization of murine members of the Polycomb group of genes

Most of our understanding of the PcG function derives from work in the fly *Drosophila melanogaster*. The products of the PcG genes form complexes which are involved in transcriptional repression of a number of developmentally relevant genes, such as the Hox genes. The molecular mechanism(s) of PcG function are not known. The PcG system is conserved throughout evolution, although its function in mammals is being studied only recently. In the lab we have identified two new murine proteins, Ring1A and Ring1B, structurally related but encoded by different genes. These proteins are transcriptional repressor that interact with PcG protein through conserved domains in both the N-terminal region (which contains a RING finger motif) and the C-terminal region. In contrast with all other mammalian PcG genes identified to date, the Ring1 genes lack a functional PcG homolog in *Drosophila*. To study Ring1 function we generated both Ring1A overexpressing and Ring1A deficient mice (the latter in collaboration with T. Magin, Bonn). Analysis of these mutant animals showed homeotic transformation and other alterations of the axial skeleton similar to those observed in PcG mutant mice. The study of the expression of Hox genes, during the maintenance phase of expression, showed anteriorization and posteriorization of the rostral boundaries of expression of some Hox genes in the loss and gain of function mutants, respectively. Taken together, these results indicate that Ring1A is a new PcG gene.

fase de mantenimiento de genes Hox, muestra efectos opuestos sobre los bordes anteriores de los dominios de expresión de algunos genes Hox (anteriorización en el modelo de pérdida de función; posteriorización, en el modelo de ganancia de función). En conjunto, los dos modelos animales proveen evidencia genética de función PcG para Ring1A.

Identificación de nuevos genes (putativos) PcG

La característica de las proteínas PcG para formar complejos ha sido utilizada para identificar componentes de esos complejos mediante la detección de sus interacciones en el sistema genético del di-híbrido en levaduras. Utilizando Ring1A fusionada al dominio de unión a DNA de LexA, hemos identificado cDNAs de una genoteca de embriones de ratón que codifican para una proteína nueva que interacciona directamente con las proteínas Ring1. Esta proteína también interacciona con YY1, un ortólogo del gen PcG de *Drosophila pleiohomeotic (pho)*. Tanto YY1 como pho tienen la capacidad de interactuar con DNA y por esto, la proteína que hemos identificado, denominada RYBP por su propiedad de unirse a Ring1 y a YY1, puede ser funcionalmente relevante en la localización de complejos PcG sobre loci específicos.

Search for new putative PcG members

A two-hybrid screen in yeast was used to search for new Ring1 interacting proteins. Using Ring1A as a bait we have identified cDNAs encoding for a new polypeptide, which also interacts with YY1. Because of this, the new protein has been termed RYBP (from Ring1 and YY1 binding protein). RYBP, like all the known PcG components acts a transcriptional repressor when tethered to reporter plasmids in transiently transfected tissue culture cells. YY1 is the mammalian ortholog of the *Drosophila* PcG gene pleiohomeotic (*pho*), and share a multizincfinger DNA binding domain. This suggests that RYBP may play a role in targeting PcG complexes to DNA.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB97-1238 (1998-2000)
- CAM, 08.1/0027/1999 (1999-2000)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Casanova, M., Bravo, A., Ramírez, A., Morreale de Escobar, G., Wére, F., Merlino, G., Vidal, M., and Jorcano, J. (1999). Exocrine pancreas disorders in transgenic mice overexpressing human keratin 8. *J. Clin. Invest.* 103, 1587-1595.
- García, E., Marcos-Rodríguez, C., Lorente, M., Moreno, J., and Vidal, M. (1999). RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *EMBO J.* 18, 3404-3418.
- Ramírez, A., Vidal, M. A., Bravo, A., and Jorcano, J. L. (1999). Transgenic animals for the determination of agents which stimulate or repress epidermal hyperproliferation and hair growth. "U.S. Patent 6,087-554".
- Lorente, M., Marcos-Rodríguez, C., Pérez, C., Schoorlemmer, J., Ramírez, A., Magin, T., and Vidal, M. (2000). Loss- and gain-of-function mutations show a Polycomb group function for Ring1A in mice. *Development* 127, 5093-5100.
- Montoliu, L., Chávez, S., and Vidal, M. (2000). Variegation associated with lacZ in transgenic animals: a warning note. *Transgenic Res.* 7, 1-3.

Control Transcripcional en Eucariotas

Control of Transcription in Eucaryotes

JAVIER REY CAMPOS

Jefe de Grupo / *Group Leader*

BEGOÑA GRANADINO GOENECHEA (Desde VIII-2000)

Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

CRISTINA PÉREZ SÁNCHEZ (Hasta XII-2000)

B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

MARÍA DEL CARMEN ARIAS DE LA FUENTE (Hasta XII-2000)

SERGIO CASAS TINTÓ

MARÍA ANA GÓMEZ FERRERÍA

FERNANDO MARTÍN DE LARA

CRISTINA PÉREZ SÁNCHEZ

B. Predoctorales / *Graduate Students*

MARÍA JOSEFA FERNÁNDEZ-CABRERA

Personal Técnico / *Technician*



Palabras clave: FHX, KIAA1041, Freac, desarrollo embrionario pre-implantación, fork head

Caracterización estructural y funcional de dos nuevos factores de transcripción: FHX y KIAA1041

Uno de nuestros objetivos fundamentales es el estudio de los mecanismos de control transcripcional en eucariotas. Actualmente estamos llevando a cabo la caracterización de dos factores de transcripción: FHX y KIAA1041. FHX (FOXJ2) es un factor de transcripción de la familia fork head, muchos de cuyos miembros han sido implicados en procesos de desarrollo embrionario. FHX es un activador transcripcional que se expresa como dos isoformas con distinta capacidad transcripcional. Reconoce dos tipos de secuencias en el DNA presentes en muchos genes de vertebrados. FHX se expresa en numerosos tejidos y órganos adultos y embrionarios aunque no en todos los tipos celulares. En el desarrollo pre-implantación de ratón FHX comienza a expresarse en el estadio de 8 células y se mantiene durante todo el desarrollo. Esto sugiere que podría tener un papel importante en los primeros eventos de diferenciación en el desarrollo temprano, probablemente en la diferenciación de los dos linajes celulares del blastocisto: el trofoectodermo y la masa celular interna. Nuestro objetivo es aproximarnos a la función biológica de FHX en el

Keywords: FHX, KIAA1041, Freac, embryonic pre-implantation development, fork head

Structural and functional characterization of two new transcription factors: FHX and KIAA1041

The main line of research of our laboratory is the study of the molecular mechanisms of transcriptional control in higher eukaryotes. Currently, we are working on the characterization of two transcription factors denoted FHX(FOXJ2) and KIAA1042(FOXJ3). Both factors are members of the Fork head family of transcription factors. Transient transfection experiments showed that FHX is a transcriptional activator. FHX is expressed as two isoforms of different size and different transcriptional capacities. FHX binds two types of DNA sequences present in regulatory regions of many vertebrates genes. It is expressed in several adult and embryonic tissues, although not in all cell types. In pre-implantation embryonic development FHX is first expressed at the 8-cell stage, coincident with the first differentiation events of early development. Thus, FHX could play some role during these stages of development, and perhaps in the differentiation of the two distinct cell lineages of the blastocyst: the trophectoderm and the inner cell mass. We want to get insight into the biological function of FHX in early embryonic development. To do so, we want to characterise target genes regulated by

desarrollo temprano buscando por un lado genes regulados por FHX que se expresen en el desarrollo pre-implantación y por otro generando mutantes de pérdida de función del gen (ratones Knock-out).

KIAA1041 (FOXJ3) es el factor de transcripción de la familia fork head con mayor identidad con FHX. Nuestros datos sugieren que ambos genes surgieron a partir de un ancestro evolutivo común por duplicación de una región genómica completa. KIAA1041 tiene una expresión materna (se expresa en oocitos sin fecundar) y una expresión zigótica muy temprana, detectándose desde el estadio de 2-células. Puesto que entre FHX y KIAA1041 puede existir algún tipo de redundancia o solapamiento funcional, queremos caracterizar en paralelo con FHX la función biológica de KIAA1041.

Mecanismos moleculares del desarrollo embrionario pre-implantación: Una aproximación a los problemas de infertilidad en el hombre y a nuevas estrategias anticonceptivas

El objetivo principal de esta línea es el estudio de los genes que se expresan durante el desarrollo embrionario pre-implantación de mamíferos, utilizando el ratón como modelo. Hasta el estadio de 2-células, el embrión utiliza RNAs y proteínas maternas presentes en el oocito. En el estadio de 2-células tardío tiene lugar la activación del genoma zigótico (AGZ) que supone la activación de genes específicos responsables de la progresión del desarrollo del embrión hasta blastocisto, como por ejemplo: los genes Oct-4, mTEAD-2, FHX y KIAA1041. Pretendemos con este proyecto conocer qué genes son necesarios para la viabilidad del embrión y/o su progresión adecuada a lo largo del desarrollo pre-implantación. Queremos determinar por un lado el repertorio de genes expresados en cada estadio de desarrollo pre-implantación: oocitos, cigotos, mórulas, mórulas compactadas y blastocistos. Por otro lado, queremos estudiar la función biológica de los genes que regulan la expresión génica durante estas etapas de desarrollo, tanto de los ya conocidos como de los nuevos que identifiquemos. Para ello, analizaremos los cambios fenotípicos y del patrón de expresión génica producidos tanto por la sobreexpresión de estos genes, como por la inhibición de su expresión mediante dsRNAi, en embriones. Creemos que los resultados de este proyecto podrían aproximarnos a la identificación de genes relacionados con problemas de infertilidad

FHX, and to analyse the FHX loss-of-function mutant (knock-out) mice.

KIAA1041 is the fork head factor showing the highest sequence identity with FHX. Our data suggest that the genes for both factors originated from a common ancestor by duplication of a large genomic region which includes some other unrelated genes. KIAA1041 has maternal expression. Its mRNA is present in the oocyte. Zygotic expression is observed in 2-cell stage embryos, coincident with the zygotic gene activation event. Given their high structural similarity and overlapped expression patterns, we believe that FHX and KIAA1041 could share some degree of functional redundancy.

Molecular mechanisms of pre-implantation development: an approach to human infertility problems, and to new contraceptive techniques

The main goal of this project is to know the genes involved in the embryonic pre-implantation development of mammals, using the mouse as a model. Up to the mid 2-cell stage, the embryo relies on maternally inherited RNAs and proteins synthesised during oogenesis. At the end of the 2-cell stage the activation of specific zygotic genes takes place. This is the case of Oct-4, mTEAD-2, FHX and KIAA1041, which are involved in the regulation of the very early differentiation events of the pre-implantation development. This project is oriented to know the genetic basis of the early development in mammals. We want to identify genes expressed in each developmental stage; oocytes, zygotes, morulae, compacted morulae and blastocysts. Furthermore, we want to study the biological function of the regulatory genes involved in these early developmental stages: Oct-4, mTEAD-2, FHX and KIAA104, and the new genes that we identify. The overexpression of these genes, or their downregulation, would give us an idea about which genes are important for the early embryo survival and/or its adequate progression through the initial phases of embryonic development. The effect of the altered expression of these genes on the normal gene expression pattern of each developmental stage, will be studied utilising the dsRNAi technology and expression vectors. The results of this project would be important to identify potential candidates of post-fertilisation infertility genes. Furthermore, the understanding of the biological functions of these regulatory genes could give us the possibility of design new contraceptives techniques. This project is in the

post-fecundación en el hombre. La falta de función de alguno de estos genes reguladores del desarrollo embrionario pre-implantación, podría originar microabortos previos a la implantación del embrión en el útero. Estos casos de infertilidad no tienen éxito en los tratamientos de fecundación in vitro, ya que el problema es posterior a la fecundación en sí. Conocer los genes necesarios para la viabilidad de los embriones y su progresión a lo largo del desarrollo pre-implantación, nos puede ayudar a entender el pronóstico clínico de muchas parejas con problemas de infertilidad. Además, paradójicamente, conocer estos genes reguladores de estas etapas de desarrollo y entender su función biológica, permitiría diseñar métodos de bloqueo de su expresión, lo que tiene interés en el diseño de nuevos métodos anticonceptivos del tipo de la "píldora del día después". Este proyecto lo hemos iniciado muy recientemente y solamente hemos obtenido resultados muy preliminares.

Clonaje y caracterización del gen *DmFoxF* de *Drosophila melanogaster*

Actualmente estamos llevando a cabo la caracterización estructural y funcional de un factor de transcripción de la familia fork head identificado en *Drosophila* y al que hemos denominado *DmFoxF*. Este factor muestra un dominio de unión al DNA del tipo fork head con una identidad muy alta con los dominios de unión al DNA de los factores FREAC1 (FOXF1) y FREAC2 (FOXF2) de mamíferos. Además del dominio fork head, también está conservado el dominio de transactivación AD1, localizado en el extremo C-terminal de las proteínas FREAC de *Drosophila* y de mamíferos. El gen de *Drosophila* se localiza en el cromosoma 3 en la región 65D4-65E1. Se extiende 4 Kb y comprende 4 exones. *DmFoxF* se expresa como dos isoformas originadas probablemente por splicing alternativo. La isoforma L, se extiende 664 aa y la isoforma S 505 aa. Ambas isoformas son idénticas hasta el aminoácido 361 y difieren en la región C-terminal. Por tanto la isoforma S pierde los últimos 41 aminoácidos del dominio fork head, correspondientes a las regiones W1, S3 y W2 características de este dominio de unión al DNA. Aunque la región C-terminal de ambas proteínas es totalmente diferente, ambas comparten un dominio rico en histidinas cuya función desconocemos hasta el momento. La proteína *DmFoxF* con-

very early beginning and our results are just very preliminary.

*Cloning and characterization of the gene *DmFoxF* of *Drosophila melanogaster**

*Currently, we are characterising the structure and function of a novel fork head factor of *Drosophila melanogaster* that we found in our laboratory and that we denoted *DmFoxF*. This fork head protein shows identity to the fork head domain and the AD1 transactivation domain of murine and human FREAC1 (FOXF1) and FREAC2 (FOXF2). The *Drosophila* gene has been mapped cytologically to 65D4-65E1 and spans 4 Kb of genomic DNA and it is split in 4 exons. Two isoforms of *DmFrac1/2* have been found, probably originated by alternative splicing from an unique gene. The L isoform spans 664 aa and the S isoform 505 aa. Both isoforms are identical in the first 361 amino acids and they differ in the C-terminal end of the protein. Thus, the S isoform lacks the final 41 amino acids of the fork head domain corresponding to the W1, S2 and the W2 regions. Although the C-terminal part of both proteins are different, both isoforms share a histidine rich domain of unknown function. *DmFoxF* protein is able to bind the same DNA sequences as vertebrate's FREAC2. However, it is unable to bind other DNA sequences recognised by other fork head factors. Both *DmFoxF* isoforms are expressed in all developmental stages of the fly: embryos, larvae, pupae and adult flies. Nevertheless, it has a spatially restricted expression pattern, as demonstrated by antibody staining experiments which show *DmFoxF* expression only in visceral mesoderm of the embryo. This suggests a possible role of *DmFoxF* in the formation of the midgut constrictions, during embryonic development. In collaboration with the group of Dr. Lucas Sánchez at the CIB, we are generating loss-of-function and gain-of-function mutant flies, taking advantage of the powerful genetic techniques of this organism.*

serva propiedades bioquímicas de las proteínas de vertebrados, ya que es capaz de reconocer las mismas secuencias de DNA que la proteína FREAC2 de mamíferos y sin embargo no se une a otras secuencias de DNA reconocidas por otros factores fork head. Las dos isoformas se expresan en todos los estadios de desarrollo de la mosca: embrión, larva, pupa y adulto. Sin embargo DmFoxF tiene un patrón espacial de expresión embrionaria restringido, limitándose al mesodermo visceral del embrión. Esto sugiere un posible papel de este gen en la formación de las constricciones del tubo digestivo medio durante el desarrollo embrionario. Para aproximarnos a la función biológica de este gen, estamos generando, en colaboración con el grupo del Dr. Lucas Sánchez del CIB, mutantes de pérdida de función y de ganancia de función del gen aprovechando las ventajas genéticas de este organismo.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, 08.9/0006/1998 (1998-2000)
- DGICYT, PM96-0005 (1997-2000)
- MCYT, PM99-0103 (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Cristina Pérez Sánchez.** FHX, un nuevo factor de transcripción de la familia fork head. Universidad Autónoma de Madrid, 1999. Director: Javier Rey-Campos.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Granadino, B., Arias de la Fuente, C., Pérez-Sánchez, C., Párraga, M., López-Fernández, L.A., del Mazo, J., and Rey-Campos, J. (2000). Murine FHX is expressed from very early in development in the two cell layers of blastocyst stage embryos and during spermatozoa differentiation. *Mech. Dev.* 97, 157-160.
 - Granadino, C., Pérez-Sánchez, C., and J. Rey-Campos. (2000). HNF-3 forkhead family of transcription factors. *Current Genomics* 1, 353-382.
 - Pérez-Sánchez, C., Arias, C., Gómez-Ferrería, M.A., Granadino, B., Velasco, A., Esteban-Gamboa, A., and Rey-Campos, J. (2000). Cloning and characterization of FHX, a novel forkhead factor widely distributed in the adult and early expressed in pre-implantation development. *J. Biol. Chem.* 275, 12909-12916.
 - Pérez-Sánchez, C., Arias, C., Gómez-Ferrería, M.A., Granadino, B., and Rey-Campos, J. (2000). The human Forkhead factor FHX can be expressed as two differently active isoforms. *J. Mol. Biol.* 301, 795-806.
-

Segregación y Eliminación de Cromosomas en Organismos Eucariotas

Chromosome Segregation and Chromosome Elimination in Eucaryotes

CLARA GODAY BAYLINA
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigadora de Carrera / Staff Scientist

ROSARIO ESTEBAN FERNÁNDEZ
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

MERCEDES JIMÉNEZ SARMIENTO (Hasta XII-1999)
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Cromosomas, segregación, proteínas, división celular

Keywords: Chromosomes, segregation, proteins, cell division

Análisis citológico y molecular de proteínas implicadas en la la segregación cromosómica

Cytological and molecular analysis of proteins involved in chromosome segregation

Se ha usado una batería de anticuerpos monoclonales para identificar antígenos asociados a componentes cromosómicos y del huso microtubular. Mediante inmunofluorescencia se ha estudiado la distribución y conservación evolutiva de los antígenos durante la división celular en diferentes organismos (levaduras, nematodos, *Drosophila*). Así mismo, se han usado los anticuerpos para rastrear librerías de expresión de cDNA y aislar los genes codificantes correspondientes. Dichos genes se han caracterizado molecularmente y se han seleccionado para realizar el análisis genético mutacional en *S. pombe* y *Drosophila*.

We have used monoclonal antibodies to identify antigens that associate to chromosomes and spindle components. By immunofluorescence techniques we have studied the conservation and cell distribution of the antigens during cell division in different systems (fission yeast, nematodes, *S. pombe*). The antibodies have been used to screen cDNA expression libraries and to isolate the encoding genes. We have carried out the molecular characterization of the genes and have undertaken the mutational analysis in fission yeast and *S. pombe*.

1) Se han identificado, en el nematodo *Parascaris* y en la levadura *S. pombe*, dos nuevas proteínas de tipo "coiled-coil", que intervienen en la organización del aparato mitótico. Dichas proteínas se asocian a los centrosomas y a la región ecuatorial durante la citocinesis. El análisis mutacional del gen correspondiente en *S. pombe* por interrupción del gen y posterior estudio del fenotipo mutante ha llevado a concluir

1) We have identified two new coiled-coil proteins that are involved in the organization of mitotic apparatus in the nematode *Parascaris* and in the fission yeast *S. pombe*. The proteins associate to the centrosomes and to the equatorial region during cytokinesis. The analysis of a *S. pombe* mutant of the gene and the study of the resulting phenotype lead to conclude that the protein (Alm) participates in the organization of the cell medium region.

2) A new *S. pombe* protein (Meics) containing numerous zinc fingers motifs has been characterized. This protein is speci-

que la proteína identificada (Alm) participa en la organización estructural de la región media celular.

2) Se ha identificado en *Drosophila* una nueva proteína (Meics) caracterizada por su alto contenido en motivos de dedos de zinc. Dicha proteína es específica de células meióticas y se caracteriza por su capacidad de translocación del núcleo al huso medio durante la espermatogénesis.

3) Se ha identificado en *Drosophila* una nueva proteína de tipo kinesina. Dicha proteína, cuyo análisis genético mutacional se está realizando, se caracteriza por su asociación al aparato mitótico y meiótico.

Eliminación de cromosomas en *Sciara*

La eliminación programada de cromosomas de origen paterno en diferentes estadios del desarrollo del insecto *Sciara* constituye un ejemplo clásico de fenómeno sometido a "imprinting" o impronta genómica. Dicho proceso ocurre: (1) durante la separación de la línea somática en la embriogénesis (eliminación de un cromosoma X o dos cromosomas X de origen paterno según el sexo del embrión); (2) en las células germinales embrionarias (eliminación de un cromosoma X paterno); y (3) durante la gametogénesis (eliminación de todo el complemento cromosómico paterno). La impronta a la que están sometidos los cromosomas paternos/maternos de *Sciara* es de naturaleza reversible dado que se elimina y se restablece de una generación a la siguiente.

Uno de los aspectos actualmente en estudio es analizar las modalidades de segregación cromosómica atípica durante la ocurrencia del fenómeno de eliminación en los diferentes tejidos de este organismo. Mediante el uso de anticuerpos, se están analizando los patrones de distribución de proteínas cromosómicas ya conocidas que son esenciales para la función centromérica y para la correcta dinámica de la segregación cromosómica.

Otro aspecto de interés es la posible existencia de diferencias o cambios en la organización de la cromatina según su origen materno/paterno en los distintos estadios del desarrollo en los que se produce el fenómeno de la eliminación. En este sentido, hemos usado anticuerpos que reconocen específicamente diferentes sitios de acetilación de las histonas H4 y H3 para caracterizar los patrones de acetilación del DNA durante el ciclo cromosómico de *Sciara*. Los resultados

son:

1) A new kinesin-like protein that associates to the mitotic and meiotic apparatus has been identified in *S. pombe* and we are currently analyzing a mutant of this gene.

Chromosome elimination in sciarid flies

The programmed elimination of paternally-derived chromosomes in different stages of development that occurs in sciarid flies constitute a classic example of an imprinted phenomenon. This process occurs: (1) during embryonic somatic line separation (loss of one X chromosome or two X chromosomes depending on the embryo sex); (2) in embryonic germ cells (loss on one paternal X chromosome); and (3) during gametogenesis (discarding of the whole paternal chromosomal set). The imprinting that affects paternal/maternal chromosomes in sciarids is reversible since it is erased and reestablished at each new generation.

We are currently studying the abnormal chromosome segregation modalities during the occurrence of chromosome elimination in different tissues. By means of antibodies we are analyzing the distribution patterns of conserved chromosomal proteins involved in centromeric function and in chromosome segregation.

We have also focussed in finding differences or biochemical modifications in chromatin organization between maternal and paternal chromosomes in different developmental stages. We have used antibodies that specifically recognize different acetylation sites of the histones H4 and H3 to characterize the acetylation patterns during chromosome cell cycle in *Sciara*. Our results show that during germ line development paternally/maternally-derived chromosomes differ in their acetylation pattern. Moreover, in sciarids histone H4 is preferentially acetylated in lysine 8 and 12 sites. The observed differences between maternal/paternal chromatin is reversible and we are currently analyzing its relation with respect to transcriptional activity during development.

demuestran que durante el desarrollo de la línea germinal los cromosomas de origen paterno y materno se acetilan de modo diferencial en las histonas H4 y H3. La acetilación de la histona H4 en *Sciara* se produce preferentemente en las lisinas 8 y 12. Dichas diferencias son reversibles y actualmente estamos estudiando su relación con la actividad transcripcional de los complementos paternos/maternos durante el desarrollo.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGYCYT, PB96-0810 (1997-2000)
- CAM, 07B/0022/1998 (1999-2000)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Goday, C., Panzera, Y., and Esteban, M R. (1999). A simple cytological technique to analyze nuclear divisions during preblastoderm development in *Drosophila*. *Chromosome Research*. 7, 1-4.
 - Jiménez, M., Petit, T., Gancedo, C., and Goday, C. (2000). The alm1+ gene from *Schizosaccharomyces pombe* encodes a coiled-coil protein that associates with the medial region during mitosis. *Molecular and General Genetics*. 262, 921-930.
 - Ruiz, M F, Esteban, M R., Doñoro, C., Goday, C., and Sánchez, L. (2000). Evolution of dosage compensation in Diptera: The gene maleless implements dosage compensation in *Drosophila* (Brachycera Suborder), but its homolog in *Sciara* (Nematocera Suborder) appears to play no role on dosage compensation. *Genetics*. 156, 1853-1865.
-

Citogenética Molecular Molecular Cytogenetics

JOSÉ LUIS DIEZ CORTES
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

GLORIA MONCILLO ORTIZ
Doctora Vinculada / Assistant Scientist

JOSÉ LUIS MARTÍNEZ GARCÍA (desde X-1999)
Científico Asociado

VICTOR M. SERRANO (desde X-2000)
Becarios de Posgrado / Graduate Students

ROSARIO GARCÍA SANCHEZ
ROSARIO LACABA
Técnicos / Technicians

Organización telomérica en *Chironomus* (Díptera)

El mecanismo de elongación telomérica en Chironómidos difiere del mediado por la acción de la telomerasa sobre secuencias cortas de 6-25 bp. En los Chironómidos estudiados hasta ahora, los telómeros están formados por bloques de secuencias repetidas complejas de 175-340 bp, que se extienden hasta los extremos de los cromosomas. Estudios recientes han mostrado que este tipo de organización se encuentra en otros Dípteros, lo que sugeriría la existencia en este inmenso grupo de especies de un mecanismo de regeneración telomérica alternativo al basado en la actividad de la telomerasa. El objetivo global de esta línea es continuar el análisis de la organización de los telómeros en Chironomidos, en la hipótesis de que pudiera ser representativa de la existente en otros grupos de Dípteros. La finalidad concreta de estos estudios es identificar los elementos básicos implicados en el mecanismo de elongación telomérica en estos organismos.

Chromatin structure and transcriptional activity in *Chironomus* cells

The "Psoralen Gel Retardation Assay" has given relevant information about the situation of active and inactive ribosomal chromatin. Besides, this methodology makes possible to analyze the regulation processes of ribosomal transcription involving changes in the number of active genes. This approach, however, has been only occasionally used to study the modifications of chromatin structure associated to transcription by RNA polymerase II. Cells from different larval tissues offer good opportunities to perform in parallel a comparative analysis of both transcription systems by using the same experimental approach: the psoralen assay.

Estructura de la cromatina y actividad transcripcional en células de *Chironomus*

La técnica del "Psoralen gel retardation assay" ha permitido avances significativos en el conocimiento de la situación de la cromatina transcripcionalmente activa e inactiva en los genes ribosómicos. Las características de esta metodología permite igualmente obtener información sobre los mecanismos de regulación de transcripción ribosómica que pueden implicar cambios en el número de genes activos. Esta aproximación ha sido, sin embargo escasamente utilizada en el análisis de los cambios de la estructura de la cromatina transcrita por RNA polimerasa II. Las células de diferentes tejidos larvarios de *Chironomus* poseen rasgos específicos que ofrecen buenas posibilidades para estudiar en paralelo las modificaciones de la estructura de la cromatina asociados a la transcripción de genes por Pol I y Pol II.

Telomeric organization in *Chironomus*

The mechanism of telomeric elongation in *Chironomus* differs from that based on the telomerase acting on short 6-25 bp sequences. In the *Chironomids* studied so far, telomeres are formed by blocks of complex, tandem repeated sequences 175-340 bp that extend to the very end of the chromosomes. Recent studies have shown that this kind of organization is present in other *Diptera*. Thus, suggesting the existence in this enormous group of species of a regeneration mechanism of the telomeres differing from the widely conserved based on telomerase. The goal of our research is to continue the analysis of the organization of telomeres in *Chironomids* since it may be representative of those present in other *Diptera*. Specifically, we are trying to identify basic elements involved in the telomeric elongation mechanism in these organisms.

Organismos Financiadores/ Funding Agencies

— MCYT. PB98-0646 (2000-2002)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

— **José Luis Martínez Guitarte**. Secuencias activadas por choque térmico en los telómeros de *Chironomus thummi*. Universidad Autónoma de Madrid, 2000. Directores: José Luis Díez Cortes y Gloria Morcillo Ortega.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- López, C.C., Rodríguez, E., Díez, J.L., Edström, J.E., and Morcillo, G. (1999). Histochemical localization of reverse transcriptase in polytene chromosomes of chironomids. *Chromosoma*. 108, 302-307.
- Gruhl, M.C., Scherbic, S.V., Aimanova, K.G., Blinov, A., Díez, J.L., and Bergtrom, G. (2000). Insect globin gene polymorphisms: intronic minisatellites and a retroposon interrupting exon 1 of homologous globin genes in *Chironomus* (Diptera). *Gene*. 251, 153-163.

Biología del Desarrollo de *Drosophila* *Developmental Biology of Drosophila*

LUCAS SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

M^a. FERNANDA RUIZ LORENZO (Desde XII-1999)
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

PEDRO PABLO LÓPEZ CASAS (Desde XII-1999 hasta IV-2000)
ESTHER SERNA SANZ (Desde VI-2000)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

ROSARIO DE ANDRÉS MONTES
DOLORES MATEOS MOYA
Personal Técnico / *Technicians*

Palabras clave: *Drosophila*, *Sciara*, determinación sexual, compensación de dosis, disco genital

Keywords: *Drosophila*, *Sciara*, sex determination, dosage compensation, genital disc

Determinación sexual en *Sciara*

En *Sciara*, todos los cigotos comienzan el desarrollo con la constitución cromosómica 3X;2A. Dos de los cromosomas X son de origen paterno. La eliminación de uno o los dos cromosomas X de origen paterno produce la señal cromosómica X:A, la cual determina el tipo de desarrollo sexual: female (2X;2A) o male (X0;2A). Se ha propuesto un modelo para el control del número de cromosomas X que se eliminan. Este modelo propone la existencia de un factor cromosómico (CF) que interacciona con el cromosoma X produciendo su eliminación. El número de cromosomas X que son eliminados está controlado por un factor materno (MF), el cual regula la cantidad de factor CF libre que puede interactuar con el cro-

Sex determination in *Sciara*

In *Sciara*, all zygotes start development with the 3X;2A chromosome constitution, two of three X chromosomes being of paternal origin. The elimination of either one or two paternal X chromosomes produces the X:A signal, which determines development along the female (2X;2A) or male (X0;2A) pathway, respectively. A model has been proposed in which a chromosomal factor (CF) positively interacts with the X chromosome(s) causing its/their elimination. The number of X chromosomes to be eliminated is controlled by a maternal factor (MF), which regulates the amount of free CF factor interacting with the X chromosomes. Imprinting refers to the inability of maternal X chromosomes to bind CF factor. This work was done in collaboration with

mosoma X. La impronta se refiere a la incapacidad del cromosoma X de origen materno de unir factor CF. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con A.L.P. Perondini, del Departamento de Biología, Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil.

Compensación de dosis génica en *Sciara*

En *Drosophila melanogaster* y en *Sciara ocellaris*, la compensación de dosis génica tiene lugar en los machos por hipertranscripción de su único cromosoma X. Se ha aislado el homólogo del gen *maleless* (*mle*) de *S. ocellaris*. Dicho gen produce un único transcrito, que codifica una proteína perteneciente a la familia de las helicasas. Su expresión es generalizada y durante todo el desarrollo de ambos sexos. La proteína Mle de *S. ocellaris* tiene una gran homología con Mle de *D. melanogaster*. El anticuerpo purificado por afinidad contra Mle de *D. melanogaster* (anti-Mle) reconoce la proteína Mle de *S. ocellaris*. Mientras que anti-Mle colorea principalmente el cromosoma X de los machos de *D. melanogaster*, indicando que la proteína Mle se encuentra básicamente asociada con dicho cromosoma, en *S. ocellaris* dicho anticuerpo colorea igualmente todos los cromosomas, indicando que la proteína Mle de *Sciara* está distribuida por todos los cromosomas. Embriones hembra de *Drosophila* no se tiñen con anti-Mle, y embriones post-blastodérmicos de macho de *Drosophila* teñidos con anti-Mle muestran una única mancha de tinción en el núcleo, mientras que los embriones macho y hembra de *Sciara* muestran múltiples puntos de tinción en el núcleo. Este patrón de expresión en *Sciara* es el mismo que el observado en embriones de *Sciara* pre-blastodérmicos, cuando aún no se ha establecido la compensación de dosis génica. Los anticuerpos purificados por afinidad contra las proteínas Msl-1, Msl-3 y Mof de *Drosophila melanogaster*, las cuales están también involucradas en implementar la compensación de dosis génica, no muestran diferencias de tinción entre el cromosoma X y los autosomas de machos y hembras de *Sciara ocellaris*. Estos resultados sugieren que las proteínas que implementan compensación de dosis génica en *Drosophila* son distintas de las que implementan compensación de dosis génica en *Sciara*. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con el grupo de C. Goday, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

A.L.P. Perondini, Department of Biology, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

Dosage compensation in *Sciara*

In *Drosophila melanogaster* and in *Sciara ocellaris* dosage compensation occurs by hypertranscription of the single male X chromosome. The gene homologous to *maleless* (*mle*) of *D. melanogaster* which implements dosage compensation has been cloned and characterized in *Sciara ocellaris*. The *Sciara mle* gene produces a single transcript, encoding an helicase, which is present in both male and female larvae and adults, and in testes and ovaries. Both *Sciara* and *Drosophila* MLE proteins are highly conserved. The affinity-purified antibody to *D. melanogaster* MLE recognizes the *S. ocellaris* MLE protein. In contrast to *Drosophila* polytene chromosomes, where MLE is preferentially associated with the male X chromosome, in *Sciara* MLE is found associated with all. Anti-MLE staining of *Drosophila* post-blastoderm male embryos revealed a single nuclear dot, whereas *Sciara* male and female embryos present multiple intra-nuclear staining spots. This expression pattern in *Sciara* is also observed before blastoderm stage, when dosage compensation is not yet set up. The affinity-purified antibodies against *D. melanogaster* MSL1, MSL3 and MOF proteins involved in dosage compensation revealed also no differences in the staining pattern between the X chromosome and the autosomes in both *Sciara* males and females. These results lead us to propose that different proteins in *Drosophila* and *Sciara* would implement dosage compensation. This work was done in collaboration with the group of C. Goday, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

Cloning and characterization of *fl(2)d* gene

The *Drosophila* gene female-lethal(2)d [*fl(2)d*] interacts genetically with the master regulatory gene for sex determination Sex-lethal. Both genes are required for the activation of female-specific patterns of alternative splicing on transformer and Sex-lethal pre-mRNAs. We have used P element-mediated mutagenesis to identify the *fl(2)d* gene. The *fl(2)d* transcription unit generates two alternatively spliced mRNAs that can encode two protein isoforms differing at their amino-terminus. The larger isoform contains a domain rich in histidine and glutamine, but has no significant homology to proteins in databases. Several lines of

Clonaje y caracterización del gen *fl(2)d*

La función del gen *fl(2)d* de *Drosophila* se requiere para el "splicing" específico de hembra del transcrito primario del gene *Sex-lethal*, el cual controla la determinación sexual y la compensación de dosis génica, y del transcrito primario del gen *transformer*, el cual controla la determinación sexual. Se generó una mutación en el gen *fl(2)d* por inserción del transposón P. Se ha clonado el gen *fl(2)d*. Dicho gen produce dos transcritos distintos por "splicing" alternativo, los cuales codifican para dos proteínas que difieren en la región amino terminal. La proteína mayor contiene un dominio rico en histidina y glutamina, y no tiene homología significativa con proteínas en banco de datos. Los resultados que indican que esta proteína es la proteína Fl(2)d son los siguientes: (1) el factor P se ha insertado en la región codificante, produciendo una proteína truncada; (2) el análisis molecular de los mutantes en el gen *fl(2)d* indican que estos alelos mutantes han resultado de cambios de amino ácidos en la proteína silvestre, existiendo una correlación positiva entre la lesión molecular y el fenotipo mutante; (3) el fenotipo mutante para *fl(2)d* puede ser suprimido por un transgén que lleva el ADNc correspondiente a la proteína mayor Fl(2)d. Esta proteína se detecta en extractos de embriones, de larvas y de adultos de *Drosophila*, sin diferencias observables entre machos y hembras. También se detecta en extractos de ovarios de adultos. Consistente con su posible papel en el "splicing" de los transcritos de los genes *Sex-lethal* y *transformer*, la proteína Fl(2)d se localiza en el núcleo. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con el grupo de J. Valcárcel, EMBL, Heidelberg, Alemania.

Desarrollo del disco genital de *Drosophila*

En *Drosophila*, el gen homeótico *Distalless* (*Dll*) juega un papel fundamental en el establecimiento de la identidad de los apéndices ventrales, tales como la pata y la antena. Se ha estudiado la función del gen *Dll* en el desarrollo del disco genital, el cual forma la terminalia, la región que muestra mayor dimorfismo sexual. El gen *Dll* se activa en el disco genital por la acción combinada de las señales morfogenéticas *Wingless* (*Wg*) y *Decapentaplegic* (*Dpp*). De los dos compo-

evidence indicate that this protein is responsible for fl(2)d function. First, the P element insertion that inactivates fl(2)d interrupts this ORF. Second, amino acid changes within this ORF have been identified in fl(2)d mutants, and the nature of the changes correlates with the severity of the mutations. Third, all the phenotypes associated with fl(2)d mutations can be rescued by expression of this cDNA in transgenic flies. Fl(2)d protein can be detected in extracts from Drosophila embryos, larvae and adult animals, without apparent differences between sexes, as well as in adult ovaries. Consistent with a possible function in post-transcriptional regulation, Fl(2)d protein has nuclear localization and is enriched in nuclear extracts. This work was done in collaboration with the group of J. Valcárcel, EMBL, Heidelberg, Germany.

Development of the *Drosophila* genital disc

In Drosophila, the homeotic gene Distalless (Dll) has a fundamental role in the establishment of the identity of ventral appendages such as the leg and antenna. The function of Dll in the genital disc has been studied. This disc forms the terminalia, the most sexually dimorphic structure of the fly. The gene Dll is activated by the combined action of the morphogenetic signals Wingless (Wg) and Decapentaplegic (Dpp) in the genital disc. During the development of the two components of the anal primordium - the hindgut and the analia - only the latter is dependent on Dll and hedgehog (hh) functions. The hindgut is defined by the expression of the homeobox gene even-skipped (eve). The lack of Dll function in the anal primordia transforms the anal tissue into hindgut by the extension of the eve domain. Meanwhile targeted ectopic Dll represses eve expression and hindgut formation. The Dll requirement for the development of both anal plates in males and only for the dorsal anal plate in females, provides further evidence for the previously held idea that the analia arise from two primordia. One primordium would produce the anal plates in a male, or the dorsal anal plate in a female; whereas the second primordium does not develop in a male, or produces the ventral anal plate in a female. This work was done in collaboration with the group of I. Guerrero, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-Universidad Autónoma, Madrid.

nentes del primordio anal, la analia propiamente dicha y el "hindgut" que une la analia con el intestino, solamente la analia requiere la función del gen *Dll* para su desarrollo, así como la función del gen *hedgehog* (*hh*). El "hindgut" requiere la función del gen homeótico *even-skipped* (*eve*). La falta de función de *Dll* en la analia activa en ésta el gen *eve* y la analia se transforma en "hindgut". La expresión ectópica de *Dll* reprime la expresión de *eve* e impide la formación de "hindgut". *Dll* es requerido para el desarrollo de las dos placas anales del macho y de la placa dorsal de la hembra, pero no para la formación de la placa ventral de la hembra. Estos resultados apoyan la idea de que el primordio anal estaría formado por dos primordios, uno que daría lugar a la analia en el macho, o a la placa anal dorsal en la hembra, y un segundo primordio que daría lugar a la placa ventral en la hembra y no se desarrollaría en el macho. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con el grupo de I. Guerrero, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-Universidad Autónoma, Madrid.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB95-1236 (1996-1999)
- CAM, 07B/0022/1998 (1999-2000)
- DGICYT, PB98-0466 (2000-2002)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **María Fernanda Ruiz Lorenzo.** El gen *maleless* de *Sciara ocellaris* Universidad Autónoma de Madrid, 1999. Director: Lucas Sánchez.
- **Pedro Pablo López Casas.** El locus *male-female-sterile (1)* de la región 6E1-2 de *Drosophila melanogaster*. Universidad de Alcalá de Henares, 2000. Director: Lucas Sánchez.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Gorfinkiel, N., Sánchez, L., and Guerrero, I. (1999). *Drosophila terminalia* as an appendage-like structure. *Mechanisms of Development* 86, 113-123.
- Sánchez, L., and Perondini, A.L.P. (1999). Sex determination in sciarid flies: a model for the control of differential X-chromosome elimination. *J.Theor. Biol.* 197, 247-259.
- Penalva, L.O.F., Ruiz, M.F., Ortega, A., Granadino, B., Vicente, L., Segarra, C., Valcárcel, J., and Sánchez, L. (2000). The *Drosophila* fl(2)d gene, required for female-specific splicing of *Sxl* and *tra* pre-mRNAs, encodes a novel nuclear protein with a HQ-rich domain. *Genetics* 155, 129-139.
- Ruiz, M.F., Esteban, M.R., Doñoro, C., Goday, C., and Sánchez, L. (2000). Evolution of dosage compensation in Diptera: the gene *maleless* implement dosage compensation in *Drosophila* (Brachycera Suborder) but its homolog in *Sciara* (Nematocera Suborder) appears to play no role in dosage compensation. *Genetics* 128, 1853-1865.

Biología Molecular de la Gametogénesis

Molecular Biology of Gametogenesis

Jesús del Mazo Martínez
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Nieves Valentín Rodrigo
Doctora vinculada/*Associated Scientist*

Cristina Templado Meseguer (Desde XI-2000)
Omar Triana Chávez (VI-1999 y X-2000)
Investigadores visitantes/*Visiting Scientists*

Luis A. López Fernández (Hasta III 2000)
Mario Párraga San Román (Hasta II 2000)
Pedro Pablo López Casas (Desde III 2000)
B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

Juan C. Ortega Lázaro
Edmundo Bonilla González (Hasta VII-2000)
Rafael García Ortega
B. Predoctorales/*Graduate Students*

Fernando Escolar Antunez
Personal Técnico/*Technician*

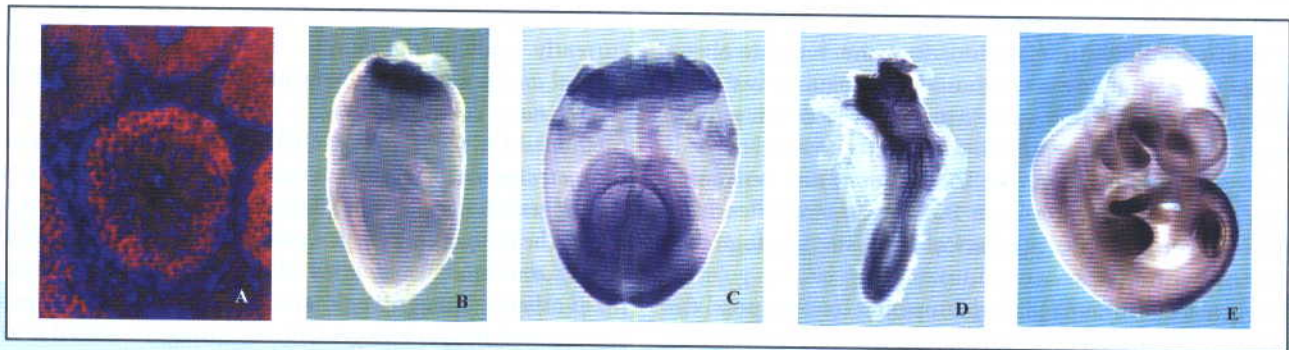


Figura. Expresión del gen para Ran GTPasa en ratón. La hibridación *in situ* usando una sonda de RNA antisentido muestra la localización de los transcritos para *Ran* sobre secciones de testículo en espermatoцитos del epitelio seminífero (A). La hibridación *in toto* en estadios tempranos del desarrollo muestra la acumulación específica de los correspondientes transcritos. (B) embrión de 7 días post-coito (dpc); (C) 7.5 dpc; (D) 8.5 dpc; (E) 10.5 dpc.

Figure. Gene expression for Ran GTPase in mouse. In situ hybridization using RNA anti-sense shows localisation of Ran transcripts in spermatocytes of the seminiferous epithelium in testis sections (A) in toto hybridization during early embryonic development displayed specific transcript accumulations. (B) Embryo of 7 days post-coitum (dpc); (C) 7.5 dpc; (D) 8.5 dpc; (E) 10.5 dpc.

Expresión y regulación génica en la gametogénesis de mamíferos

Hemos continuado con el análisis y caracterización funcional de diversos genes de expresión diferencial durante la gametogénesis. Así, el gen denominado inicialmente *XYbp* clonado en el laboratorio como un nuevo miembro de la familia de proteínas RING-finger, y denominado ahora *Rnf19*, presenta unas características específicas de regulación transcripcional y postranscripcional en espermatogénesis. Se comprobó que un alto nivel de expresión iba asociado a la diferenciación meiótica y a una poliadenilación alternativa y no canónica de su RNA específico de estas células. En su región reguladora se han identificado elementos HSEs (choque térmico) que, en experimentos de transfección con genes marcadores, han demostrado ser funcionales. La participación de este gen, altamente conservado evolutivamente, esta siendo ampliamente estudiada en otros procesos de diferenciación.

Tex27 es un gen que hemos clonado a partir de genotecas sustractivas de cDNA, cuya expresión es diferencial a partir de células postmeióticas en testículo, presentando su proteína un dominio zinc-finger y otro de transactivación. Podría corresponder a un factor de transcripción con actividad preferencial en células germinales después de la meiosis.

En el estudio de la expresión en espermatogénesis de una proteína-fosfatasa: PP2A, hemos clonado y caracterizado el gen correspondiente a una de sus subunidades reguladoras: B56. La expresión de PP2A-B56 viene asociada a la de un gen de expresión específica de epitelio seminífero (*Mea*), con un transcrito que en su región 3' UTR presenta una secuencia inversa y complementaria a la de B56. Se esta estudiando el potencial mecanismo de regulación en esta situación de mRNAs anti-sentido *in vivo*.

Mediante distintas colaboraciones con grupos de: Universidad de Cantabria, CNB, CBM y CIB, hemos analizado el papel funcional de diversos genes en el desarrollo de la gametogénesis. Así, hemos estudiado la regulación y función del gen codificante para p14 (cofactor A), que forma complejos estables con β -tubulina y participa en su plegamiento. Se ha podido comprobar como esta chaperona esta participando en procesos, como espermatogénesis donde existe una remodelación microtubular en células germinales, aumentando la acumulación de su mRNA, por regulación transcripcional.

Gene expression and regulation in mammalian gametogenesis

We are progressing in the analysis and functional characterisation of genes displaying differential expression during gametogenesis. The gene *Rnf19*, (initially named *XYbp*) was cloned in our laboratory as a new member of a family of proteins with RING-finger domains. *Rnf19* shows transcriptional and posttranscriptional regulation in spermatogenesis. A high level of expression is associated with meiotic differentiation and a non-canonical and alternative polyadenylation of the mRNA is specifically detected in these cells. Heat shock elements (HSEs) have been identified in the promoter regions of this gene, being functional in cell transfection experiments. *Rnf19* is evolutionary conserved and we are studying its role in process of differentiation and development.

Tex27 is a new gene in the family of zinc-finger proteins cloned from subtractive cDNA libraries. *Tex27* presents a transactivation domain and a differential expression from postmeiotic cells in testis. The characteristics of this gene suggest a potential role as transcription factor in germ cells after meiosis.

We have also cloned the gene coding for the regulatory subunit B56 of a protein phosphatase: PP2A. The expression of B56 is related to the expression of a gene (*Mea*) with specific regulation in seminiferous epithelium. The *Mea* transcript presents an inverted and complementary 3' end UTR to the B56 mRNA. We are currently studying the putative regulatory mechanisms of this natural anti-sense genomic organisation.

We have collaborated with different research groups from Cantabria University, CNB, CBM and CIB in the analysis and characterisation of the functional role of different genes in the gametogenesis development. That is, we have studied the regulation of the gene coding for p14 protein (cofactor A). The p14 chaperon forms stable complexes with β -tubulin and participates in the β -tubulin folding. We demonstrated that p14 participates in process such as spermatogenesis, increasing the mRNA and peptide levels by transcriptional regulations during germ cell differentiation.

A new gene coding for a novel DNA polymerase (*Pol λ*) has been characterised. We have demonstrated that *Pol λ* is highly expressed in pachytene spermatocytes and developmentally regulated. A potential role of *Pol λ* in DNA repair synthesis associated with meiosis is strongly suggested.

The synaptonemal complex is a specific structure of meiotic

Una nueva DNA polimerasa (pol) ha sido caracterizada comprobando su alto nivel de expresión en espermatocitos paquiténicos y su posible su funcionalidad asociada a mecanismos de reparación de DNA durante la meiosis.

Una estructura específica de células meióticas es el complejo sinaptonémico. Se ha podido demostrar que una nueva proteína del grupo de las estromalinas (STAG3) forma parte del complejo en células en profase meiótica, siendo el gen STAG3 expresado específicamente en testículo. STAG3 y genes relacionados tienen loci que mapean en la especie humana flanqueando puntos de rotura asociados con la delección del Síndrome de Willians-Beuren, originado por sobre-cruzamiento meiótico desequilibrado.

Se están analizando otros genes que si bien tiene expresión funcional en diversos procesos de diferenciación, presentan una expresión preferencial en testículo. Así, hemos analizado la regulación del gen *Ran GTPasa* durante la espermatogénesis, donde su expresión esta asociada a la diferenciación de células germinales. Paralelamente se ha estudiado, por hibridación *in situ* e *in toto*, la expresión tejido-específica de *Ran GTPasa* durante la embriogénesis temprana de ratón.

El gen codificante para *Ilf2* tiene expresión regulada en espermatocitos paquiténicos y hemos comprobado que su proteína se asocia a cromatina transcripcionalmente inactiva tanto en células germinales como somáticas.

Desregulación génica y reprotoxicidad

Datos epidemiológicos y fisiológicos están poniendo de relieve el impacto que múltiples sustancias de nuestro entorno están ejerciendo sobre el desarrollo de las células germinales. Existen referencias sobre el efecto final de diversos compuestos sobre el desarrollo de las gónadas y de la gametogénesis, pero se desconocen claramente sus mecanismos de acción. En base a cultivos *in vitro* de células germinales y su análisis comparativo *in vivo*, hemos llevado a cabo un análisis para caracterizar genes que modificaran su nivel de expresión como efecto de varios tóxicos tanto medioambientales como farmacológicos. *In vitro*, nuestro estudio se ha centrado sobre tres tipos celulares: células primordiales germinales (PGCs), oocitos fetales y células de Sertoli. Estos tres tipos celulares fueron cultivados y tratados con reprotóxicos potenciales. Se hicieron pruebas de viabilidad y, mediante genotecas de

cells. We have demonstrated that a novel protein member of stromalins STAG3 is associated to the synaptonemal complex in prophase of meiotic cells. STAG3 is specifically expressed in testis. STAG3 and related genes map in humans flanking the breakpoints commonly associated with the Willians-Beuren syndrome. Since The WBS deletion occurs as a consequence of unequal meiotic crossing over, the STAG3 duplications could predispose to germ-line chromosomal rearrangement within this region.

We are also analysing other genes that have functional expression in process of differentiation showed preferential expression in testis development. The regulation of gene expression of *Ran GTPase* has been studied during gametogenesis, being associated to the differentiation of germ cells. In addition the tissue specific expression of *Ran GTPase* in mouse early embryogenesis has been analysed by *in situ* and *in toto* hybridization.

We also demonstrated that the gene coding for *Ilf2* shows regulated expression in pachytene spermatocytes and the protein is associated to inactive chromatin both in germ and somatic cells.

Gene deregulation and reprotoxicity

Epidemiological and physiological data have pointed out the deleterious effects that some substances accumulated in the environment are exerting upon germ cells. Multiple reports have been published concerning the consequences of the potential reprotoxicants upon the development of the gonads and the gametogenesis process. However, the mechanisms of action of these compounds are basically unknown. Based on *in vitro* culture systems of germ cells and in the analysis obtained by *in vivo* results, we have investigated gene deregulation as effect of different, both pharmacological and environmental, toxicants. The *in vitro* approach has been focussed on the analysis of three cell types: primordial germ cells (PGCs), foetal oocytes, and Sertoli cells. These cells were cultured and treated with potential reprotoxicants. By viability tests and cDNA libraries from isolated cells, we selected and cloned 150 deregulated genes. These genes, after sequencing were classified in different metabolic and differentiation pathways. Some selected genes have been analysed from functional point of view, by transfection experiments in cultured cells, using promoter regions and markers peptides. Functional studies have been done in normal and stress conditions. These selected genes

cDNA de estas células aisladas y análisis diferencial con distintos tratamientos, se seleccionaron, clonaron y secuenciaron un total de más de 150 genes implicados en distintas rutas metabólicas o de diferenciación. Algunos de estos genes han sido analizados desde un punto de vista funcional, mediante transfecciones a células en cultivo usando péptidos marcadores controlados por los promotores de los genes seleccionados, tanto en situación normal como bajo estrés tóxico. Esta selección de genes así como nuevas búsquedas están siendo valoradas como potenciales marcadores moleculares de toxicidad en células germinales y su posible aplicación a microchips en pruebas de toxicología reproductiva.

Desarrollo y aplicación de tecnologías genómicas en la identificación molecular de procariotas y eucariotas inferiores

Nuestro grupo presta apoyo metodológico y colaboración en proyectos encaminados a la caracterización genética y molecular de organismos biodegradantes y protozoos parásitos. Muchos de los abordajes experimentales empleados en el análisis de la expresión génica en células germinales de mamíferos están siendo adaptados y aplicados a la identificación de especies y al análisis de la expresión génica diferencial en organismos como *Trypanosoma*. Así mismo, algunos tratamientos parasitocidas, están siendo evaluados desde la perspectiva de la expresión génica diferencial y en comparación con el efectos sobre células de mamíferos.

and new ones that we are selecting are being assessed as molecular markers of reprotoxicity and in the generation of microchips for reproductive toxicology tests.

Development and application of genomic technologies to molecular identification of prokaryotes and lower eukaryotes

Our group give methodological support and collaborations to projects involved in molecular and genetic characterisation of biodegrading organisms and parasitic protozoa. Some experimental approaches used in the analysis of gene expression in mammalian germ cells are being adapted to the study and identification of lower eukaryote species such as Trypanosoma and to the analysis of differential gene expression. The gene expression in these organisms is being assessed after parasitocide treatments when is compared with the genetic effects upon mammalian cells.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB95-0119 (1996-1999)
- CE-Biotech, BIO4-CT96-0183 (1996-1999)
- CAM, 07B/0022 (1997-1999)
- MECYT, PCCI (2000-2001)
- CICYT, AMB1999-1785-E (2000-2001)
- CICYT, BMC2000-1127 (2000-2003)
- CE, EVK4-CT-1999-00061 (2000-2002)

Tesis Doctoral/Doctoral Thesis

- **Edmundo Bonilla González.** Desarrollo de cultivos in vitro de oocitos de mamíferos. Análisis de la expresión génica diferencial en ensayos de toxicología. Universidad Autónoma de Madrid, 2000. Director: J. del Mazo.

Publicaciones/Publications

- De Luis, O., López-Fernández, L.A., and del Mazo, J. (1999) Tex27, a gene containing a zinc-finger domain, is up-regulated during the haploid stages of spermatogenesis. *Exp. Cell Res.* 249, 320-326.
 - Fanarraga, M.L., Párraga, M.A., Aloria, K., del Mazo, J., Avila, J., and Zabala, J. C. (1999). Regulated expression of p14 (cofactor A) during spermatogenesis. *Cell Motil. Cytoskel.* 43, 243-254.
 - García-Díaz, M., Domínguez, O., López-Fernández, L.A., Laín, M., Saniger, M.L., Ruíz, J.F., Párraga, M., García-Ortiz, M.J., Kirchhoff, T., del Mazo, J., Bernard, A., and Blanco, L. (2000) DNA polymerase lambda (pol λ) a novel eucaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J. Mol. Biol.* 301, 851-867.
 - Granadino, B., Arias de la Fuente, C., Pérez-Sánchez, C., Párraga, M., López-Fernández, L.A., del Mazo, J., and Rey-Campos, J. (2000). Murine FHX is expressed from very early in development in the two cell layers of blastocyst stage embryos and during spermatozoa differentiation. *Mech. Dev.* 97, 157-160.
 - Párraga, M., del Mazo, J. (2000) "XYbp, a novel RING finger protein is a component of the XY body of spermatocytes and centrosome" *Mech. Develop.* 90 (1), 95-101.
 - Pezzi, N., Prieto, I., Kremer, L., Pérez-Jurado, L., Valero, C., del Mazo, J., Martínez-A, C., Barbero, J.L. (2000) STAG3, a novel gen involved in meiotic chromosome pairing and location of human STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J.* 14, 581-592.
-

Biología de la Reproducción

Biology of Reproduction

PEDRO ESPONDA FERNÁNDEZ
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ROSA CARBALLADA DÍAZ
Investigadora Asociada / Associate Research

EVA HUGUET GUTIÉRREZ (Hasta XII-1999)

HUGO DÍAZ MURILLO (Desde X-1999)

MIGUEL RELLOSO CEBECEDA (Hasta XII-1999)

TELDA DEGEFA (Hasta X-1999)

VERÓNICA ROJAS DURÁN (Hasta IX-1999)

MARCO JARA GONZÁLEZ (Desde I-1999)

B. Predoctorales / Graduate Students

ASCENSIÓN GONZÁLEZ DÍAZ
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Espermatozoides, oocitos, oviducto, transfecciones, transgénicos

Modificaciones genéticas inducidas en tejidos reproductores de mamíferos

En el tracto genital femenino se ha transfectado el epitelio que tapiza el útero y el oviducto (trompas de Falopio). Para realizar las transfecciones de estos epitelios se han utilizado genes marcadores muy difundidos como el de la B-galactosidasa y el de Proteína Verde Fluorescente (GFP) cuya expresión puede ser fácilmente detectada bajo el microscopio óptico. Como vehículo de los transgenes se utilizaron diferentes liposomas. En el útero se observó que un porcentaje de las células epiteliales se transfectaba y que este fenómeno se observaba de preferencia en el fondo de las glándulas uterinas. Mientras, en el oviducto, las áreas más afectadas eran las regiones del istmo y de la juntura. La duración de la expresión del transgén fue hasta de 15 días y la eficiencia aparecía afectada por el estado hormonal en que se encontraban las hembras, de forma que las transfecciones más eficientes ocurrían

Keywords: Oocytes, oviduct, spermatozoa, transfections, transgenics

Genetic modifications induced in mammalian reproductive tissues

The uterine and oviductal epithelium were transfecting using two reporter genes, B-galactosidase and GFP (Green Fluorescent Protein). The expression of both genes was easily detected under the microscope. In all cases DNA constructs were complexed to different types of liposomes and then injected into the fimbrial region of the oviduct. 9% of cells appeared transfecting in the uterus in which the uterine glands were the most transfecting region. In the oviduct a similar percentage was transfecting, and the isthmus and junctura were the regions in which the higher number of transfecting cells appeared. Expression of the transgenes occurred during 15 days, and transfection efficiency appeared clearly controlled by the hormonal status of the females analyzed. The highest efficiency in transfection was found during metaoestrous and pseudopregnancy stages, when progesterone and estradiol levels changes.

durante el metaestro y en estado de pseudopreñez. Estos son periodos en los cuales se presentan cambios en las cantidades circulantes de progesterona y de estradiol.

La utilización de estos procedimientos de transfección puede ser el punto de partida para futuras transfecciones en otras especies, con intenciones incluso biomédicas.

Modificaciones genéticas inducidas en gametos de mamíferos

1) Espermatozoides.- En trabajos anteriores se observó que luego de una inyección de transgenes en los vasos deferentes el 70% de los espermatozoides contenidos en estos conductos se transfectaba. En base a ello parecía lógico asumir que si los machos inyectados copulaban con hembras normales podrían producir hijos transgénicos. Los experimentos, utilizando como transgen el gen marcador GFP, mostraron que esto ocurría y que el 7.5 % de las generaciones producidas era transgénico. El riñón, el hígado, la pared abdominal y el pulmón fueron los órganos en que apareció una mayor expresión del transgen. Dicha expresión se apreció gracias al empleo de diversos métodos moleculares, así como por la observación de que algunas células extraídas de estos animales fluorescían en verde incluso cuando eran observadas *in vivo*.

2) Oocitos y embriones.- Los oocitos y embriones jóvenes de ratón fueron transfectados utilizando los transgenes acoplados con liposomas catiónicos. El éxito de la transfección fue elevado y en algunos casos (como en oocitos inmaduros u ovulados) llegó al 97 %. Se apreció que la zona pelúcida madura era una barrera para la entrada de genes y por lo tanto que el éxito de la transfección dependía de que esta envoltura estuviera permeabilizada. Un hecho importante fue que los embriones desarrollados a partir de oocitos transfectados eran capaces de expresar el transgen en sus blastómeras. Este hecho, que actualmente está siendo analizado más ampliamente muestra la posibilidad de utilizar estos procedimientos como una alternativa para desarrollar animales genéticamente modificados.

The employ of this procedure seems important when thinking in future applied methodologies, particularly for those of biomedical purposes.

Genetic modifications induced in mammalian gametes

Spermatozoa.- Previous work from our laboratory showed that the injection of transgenes into the vas deferens of the mouse produced transfection in the 70% of spermatozoa contained in the vas. Then, it was logical to assume that if the injected males mated normal females, a transgenic offspring would be produced. Experiments using the reporter gene GFP showed that this situation occurred in 7.5% of the pups. The kidney, liver, abdominal wall and lung were the sites in which the higher expression of the transgene was observed. GFP expression was analyzed using different molecular procedures as well as by the microscopical observation of green fluorescence in living cells.

Oocytes and early embryos.- Mouse oocytes and early embryos were transfected using GFP gene construction complexed to cationic liposomes. In some cases (as in immature and ovulated oocytes) the 97% were transfected under these conditions. The zona pellucida, that covers the egg, was a barrier for transfection. Then, transfection depended whether the zona was chemically permeabilized. Transfected embryos showed GFP gene expression. These results suggest the possibility to employ these procedures as an alternative method to generate transgenic animals.

Factors related to mammalian fertility

The effects of immunization of female rats using as antigen the proteins secreted by the seminal vesicle were analyzed. After immunization all females showed antibodies in their blood serum and the 26% of them were sterile. The study of the fertilization as well as of the early embryos generated by these sterile females showed that the site of action of the antibody was the oviduct, and that a delay in fertilization and embryo development occurred. Results suggest that seminal vesicle proteins would control the spermatozoon capacitation phenomena and/or gamete transport to the site of fertilization.

Factores que comprometen la fertilidad de los mamíferos

Continuando con estudios desarrollados con anterioridad, hemos analizado el efecto que se produce en las hembras de rata luego de una inmunización que utiliza como antígeno las proteínas secretadas por las vesículas seminales. Un tiempo después de la inmunización se apreció que todas las hembras desarrollaban anticuerpos y que el 26% resultaba estéril, lo cual ya indicaba la importancia de estas secreciones en la fertilidad. El análisis de la fecundación y de los embriones jóvenes generados por estas hembras estériles demostró que el sitio de acción de los anticuerpos era el oviducto y que existía un retraso en la fecundación y en la embriogénesis. Estos resultados sugieren que la presencia de estas proteínas podría controlar la capacitación espermática y/o el transporte de los espermatozoides dentro del tracto genital femenino.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGIICYT, PB96080 (1997-2000)
- CAM, 07B/0023/1997 (1998-1999)

Tesis Doctoral/*Doctoral Thesis*

- **Eva Huguet Gutierrez**. "Transfección de espermatozoides como un posible método para generar animales modificados genéticamente". Universidad Autónoma de Madrid, 1999. Director: Pedro Esponda.
- **Miguel Relloso Cereceda**. "Transfección in vivo del tracto reproductor femenino del ratón". Universidad Autónoma de Madrid, 1999. Director: Pedro Esponda.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

- Carballada, R., and Esponda, P. (1999). Effect of antibodies against seminal vesicle secretion on fertility in the rat. *Zygote* 7, 223-231.
- Guerra, R., and Esponda, P. (1999). Structure, cytoskeleton and development of the acrosome of *Platycleis albopunctata* (Orthoptera: Tettigoniidae). *J. Morphology* 242, 47-56.
- Carballada, R., Degefa, T., and Esponda, P. (2000). Transfection of Mouse Eggs and Embryos using DNA combined to Cationic Liposomes. *Mol. Reproduct. Dev.* 56, 360-365.
- Huguet, E., and Esponda, P. (2000). Generation of genetically modified mice by spermatozoon transfection in vivo: Preliminary results. *Mol. Reproduct. Dev.* 56, 243-247.
- Kirchhoff, C., Carballada, R., Harms, B., Kascheike, I. (2000). CD52 mRNA is modulated by androgens and temperature in epididymal cell cultures. *Mol. Reproduct. Dev.* 56, 26-33.
- Relloso, M., and Esponda, P. (2000). In vivo transfection of the female reproductive tract epithelium. *Molecular Human Reproduction* 6, 1099-1105.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

- Esponda, P. (2000). *Seres del Futuro: de la fecundación in vitro a los clónicos y transgénicos*. Editorial Libertarias Prodhufo. Madrid.

Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados

Growth Factors in Vertebrate Development

FLORA DE PABLO

Jefa de Grupo / *Group Leader*

ENRIQUE J. DE LA ROSA

Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

CARLOS VICARIO ABEJÓN (Desde IV-1999)

CATALINA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ (Desde V-2000)

Investigadores Contratados / *Research Associates*

ANA I. VALENCIANO (Desde I-2000)

CAROLINA ISIEGAS (I-IX, 2000)

B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

BELÉN PIMENTEL (Hasta VII-I 1999)

EVA RUBIO

CARMEN FERNÁNDEZ MORENO

M^oJOSÉ YUSTA (Desde IX-1999)

ALICIA MANSILLA (Desde VII-2000)

BEGOÑA DÍAZ (Hasta XI-1999)

JOSÉ SERNA LÓPEZ (Hasta VII-1999)

NOELIA SÁNCHEZ (Desde X-1999 Hasta XI-2000)

B. Predoctorales / *Graduate Students*

VIRGINIA QUESADA (Hasta X-2000)

Personal Técnico / *Technician*

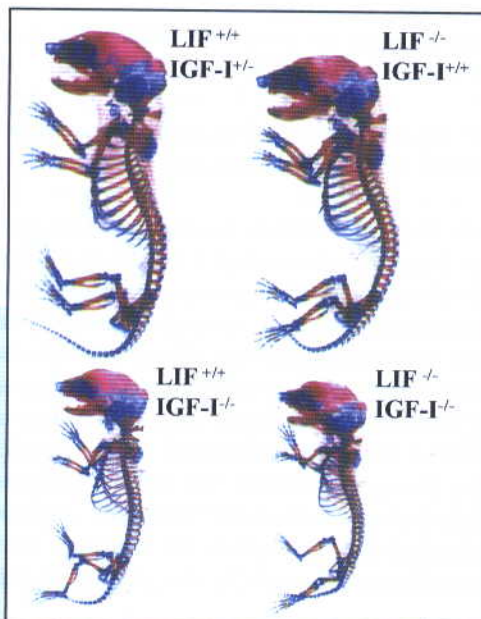


Figura. Retraso del crecimiento progresivo en ausencia de IGF-I y LIF. El fenotipo de esqueleto de embriones de ratón de día 18.5 mutantes para uno o los dos factores demuestra cooperación en la osificación y el crecimiento (J.G. Pichel, C. Fernández Moreno, C. Vicario Abejón, and F. de Pablo, enviado para publicación).

Figure. Progressive delayed growth in the absence of IGF-I and LIF. The skeleton phenotype of mouse embryos at day 18.5 mutant for one or both factors show cooperation in ossification and growth (J.G. Pichel, C. Fernández Moreno, C. Vicario Abejón, and F. de Pablo, submitted)

Palabras clave: Desarrollo, apoptosis, neurogénesis, células madre, gen proinsulina

Regulación transcripcional y postranscripcional del gen de la proinsulina y su papel en el embrión temprano

La insulina, en su forma precursora de proinsulina, se expresa en etapas muy tempranas del desarrollo, antes de que aparezca el páncreas. Nuestro grupo se ha centrado en caracterizar sus efectos como factor de crecimiento empleando modelos animales (pollo, ratón y, ocasionalmente, *Drosophila* y líneas celulares humanas). En el caso humano, no están claras las causas de que los fetos de madre diabética tengan una proporción mayor de malformaciones que los de gestantes normales. Una disfunción de la acción temprana de la proinsulina/insulina podría ser un elemento contribuyente. En el embrión de pollo prepancreático, durante la neurulación, la insulina ejerce una función antiapoptótica (ver apartado siguiente). Dada esta función como factor de crecimiento y supervivencia embrionario, distinta de su función hormonal clásica, y la falta de respuesta del RNA de la proinsulina prepancreática al estímulo de la glucosa, decidimos abordar el estudio de su regulación génica con la hipótesis de que debía ser diferente a la regulación de la expresión pancreática. Efectivamente, los transcritos prepancreáticos presentan al menos 2 secuencias 5' no traducidas alternativas a la del mRNA pancreático que era el único descrito hasta el momento (*Diabetes, en prensa*). Actualmente estamos estudiando la regulación de dichos transcritos alternativos, también en el contexto de un posible agrupamiento génico conservado evolutivamente que incluye, entre otros, al gen de otro factor de la familia, el IGF-II (*insulin-like growth factor II*).

Caracterización de la muerte celular programada durante la neurogénesis y su regulación por factores de crecimiento y Hsc70

Los estudios en modelos experimentales de Biología del Desarrollo de los últimos 50 años han permitido recientemente comprender la relevancia de la muerte celular por apoptosis en la fisiología normal de un organismo y en la etiología de numerosas patologías, incluyendo cáncer, infecciones virales, enfermedades autoinmunes y enfermedades neurode-

Key words: Development, apoptosis, neurogenesis, stem cells, proinsulin gene

Transcriptional and postranscriptional regulation of the proinsulin gene and its role in early embryos

Insulin, in its precursor form proinsulin, is expressed in very early stages of development, before the differentiation of the pancreas. Our group has focused in characterizing proinsulin/insulin effects as a growth factor, using animal models (chick, mouse and, occasionally, *Drosophila* and human cell lines). In the case of humans, the reasons for an increased incidence of malformations among the fetus of diabetic mothers are not completely clear. A malfunction of the early embryonic proinsulin/insulin could be a contributing factor. In the prepancreatic chick embryo, during neurulation, insulin exerts an antiapoptotic function (see next paragraph). In view of this function as a growth/survival factor in embryogenesis, we decided to approach the study of proinsulin gene regulation in the early embryo, with the hypothesis that it might be different from the pancreatic. Indeed, the prepancreatic transcripts contain at least two different 5'UTR sequences, alternative to the pancreatic insulin mRNA, the only described so far (*Diabetes, in press*). Presently, we are studying the regulation of those alternative transcripts, also in the context of a possible gene cluster conserved in evolution and that includes, among others, the gene for another member of the family, IGF-II (*insulin-like growth factor II*).

Characterization of programmed cell death during neurogenesis and its regulation by growth factors and Hsc70

During the last 50 years, studies in developmental model systems have provided support to the concept of the relevance of programmed cell death (apoptosis) for normal physiology and its involvement in an increasing number of diseases, including cancer, viral infection, autoimmune and neurodegenerative diseases. Following this line, we approach the incidence and regulation of apoptosis during early neural development in chick and mouse, at stages little studied. Programmed cell death is a genuine developmental process during neurulation and early neurogenesis. Both cell extrinsic factors, such as the proinsulin mentioned above, and cell intrinsic factors, such as the chaperone Hsc70, contribute to its regulation. Proinsulin/insulin, in addition, upre-

generativas. Siguiendo dicha línea argumental, estamos caracterizando la incidencia y regulación de la apoptosis en etapas tempranas, poco estudiadas, del desarrollo del sistema nervioso en vertebrados, pollo y, más recientemente, ratón. La muerte celular programada es un proceso natural durante la neurulación y la neurogénesis temprana de la retina que está atenuada tanto por factores de crecimiento extracelulares, la proinsulina antes mencionada, como por factores intrínsecos celulares, la expresión de la chaperona Hsc70, controlada a su vez por proinsulina. Al haber resultado que la proinsulina/insulina es un potente factor antiapoptótico durante el desarrollo, capaz de activar varias vías paralelas de supervivencia, hemos recientemente iniciado el estudio de su posible aplicación terapéutica en patologías neurodegenerativas, en concreto en los ratones *rd* que sufren una distrofia hereditaria de la retina equivalente a la enfermedad humana de la retinosis pigmentaria.

Cooperación funcional de la citokina LIF y el IGF-I

La regulación precisa del desarrollo embrionario requiere la interacción de señales extrínsecas e intrínsecas celulares. Ambas, además, actúan en redes con funciones específicas, dependiendo del momento del desarrollo de las células implicadas y de las combinaciones de factores de crecimiento y diferenciación. Dentro de los factores de interés para nuestro grupo, hemos abordado la posible cooperación funcional de IGF-I y LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) en un modelo de dobles ratones mutantes nulos. Dichos ratones mueren perinatalmente, lo que no pasa con los mutantes sencillos, poniendo en evidencia un sinergismo entre ambos factores en el control de funciones vitales. La histopatología del pulmón y el hueso (ver Figura) de los mutantes nulos para IGF-I se encontró exacerbada en los dobles mutantes, con retrasos del desarrollo también apreciables en el músculo y la piel. La mayor parte del sistema nervioso central no presentaba defectos evidentes en ninguno de los mutantes sencillos o dobles, con la excepción del bulbo olfatorio en los mutantes de IGF-I, que mostraba una severa pérdida de células mitrales y alteración de la glía radial. Estas observaciones ponen de manifiesto las diferentes relaciones de cooperación entre ambos factores durante el desarrollo embrionario dependiendo del tejido en cuestión.

gulate Hsc70, being a potent survival-inducing factor during embryonic development. Therefore, we have started its characterization as survival factor in neurodegenerative diseases, in particular in the rd mice, a model system for retinitis pigmentosa.

Functional cooperation of the cytokine LIF and IGF-I

The precise regulation of embryonic development requires the interaction of intrinsic and extrinsic cellular signals that act in networks with specific functions depending of the time in development, of the types of cells and of the combination of growth and differentiation factors present. Among the factors of interest to us, we have initiated the analysis of the possible functional cooperation of IGF-I and LIF in a model of double null mutants. These mice die perinatally, in contrast with the single gene mutants, unraveling a synergism between both factors for the control of vital functions. The histological phenotype in the lung and bone (see Figure) was more marked in the double mutants with delayed development also found in the muscle and skin. The vast majority of central nervous system areas had no phenotype in the single or double mutants, with the exception of the olfactory bulb in the IGF-I mutants, in which a severe loss of mitral cells and disorganization of radial glia was evident. These observations show the distinct tissue dependent relationships and functional cooperation of the two factors during development.

Neural Stem cells and their modulation by growth factors

Stem cells are defined as cells having the ability to self-renewal and the potential to differentiate in the multiple cell phenotypes present in an adult organism or tissue. Research on stem cells has a great relevance due to the potential therapeutic applications of these cells. However, it is thought that the therapeutic use will first require a deep knowledge of stem cell biology during development. Our group has started a project with the aim of obtaining and characterizing stem cells prepared from the mouse olfactory bulb and, in the near future, from the retina. In fact, olfactory bulb-derived cells having a high proliferative capacity and the potential to differentiate into the main cell types of the CNS, i.e., neurons, astrocytes and oligodendrocytes are already being grown in our laboratory. This in vitro system allows us to study the biochemical and gene expression regulation aspects of neurogenesis in primary cells, having no limitations of biological material and a more synchronized system than that occurring in the in vivo situation.

Células madre neurales y su modulación por factores de crecimiento

Las células madre son aquellas que, presentando capacidad de autorrenovación, mantienen su potencial de diferenciación a múltiples, sino a todos, los fenotipos celulares presentes en un organismo o tejido adultos. El estudio de las células madre es una línea de máxima actualidad por sus posibles aplicaciones terapéuticas. Pero dicho uso requerirá, muy posiblemente, un profundo conocimiento de su biología en condiciones de desarrollo normal. Nuestro grupo ha iniciado recientemente la obtención y caracterización de células madre neurales procedentes del bulbo olfatorio de ratón y prevé, en un futuro próximo, iniciar un trabajo paralelo con la retina. En el caso del bulbo olfatorio, se dispone ya de células con alta capacidad de proliferación y que se diferencian a los principales tipos celulares presentes en el sistema nervioso, es decir, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Esto nos permite reproducir la neurogénesis *in vitro* con células primarias sin limitación de material (esencial para estudios de regulación de la expresión génica y bioquímicos) y de una manera mucho más sincrona que la que se da *in vivo*.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MEYC, PM96-0003 (1997-2000)
- CAM, 8.6/0018/1997 (1998-1999)
- MEYC, PM97-0143 (1998-2001)
- CAM, 8.1/0029/1999 (2000)
- CAM, 8.6/0019/1999 (2000)
- MCYT, PM99-0094 (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Belén Pimentel de Francisco.** Proliferación y diferenciación en el sistema nervioso central: Papel de la Insulina e implicación de Raf en el desarrollo. Universidad Complutense de Madrid, 1999. Directores: Flora de Pablo y Enrique J. de la Rosa.
- **Begoña Díaz Fernández.** Características y mecanismos de regulación de la muerte celular programada durante la neurogénesis temprana en la retina de embrión de pollo. Universidad Autónoma de Madrid, 1999. Director: Enrique J. de la Rosa.
- **Eva Rubio García.** El proceso de muerte celular programada en las etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso: Distribución, regulación y poblaciones afectadas en el embrión de pollo. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Director: Enrique J. de la Rosa.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Díaz, B., Pimentel, B., De Pablo, F., and de la Rosa, E.J. (1999). Apoptotic cell death affecting proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 1624-1632 (and cover).
- García-de Lacoba, M., Alarcón, C., de la Rosa, E.J., and De Pablo, F. (1999). Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. *Endocrinology* *140*, 233-243.
- Raab, U., Lastres, P., Arevalo, M.A., López-Novoa, J.M., Cabanas, C., de la Rosa, E.J., and Bernabeu, C. (1999). Endoglin is expressed in the chicken vasculature and is involved in angiogenesis. *FEBS Lett* *459*, 249-254.
- Vega-Núñez, E., Peña, A., de la Rosa, E.J., and De Pablo, F. (1999). Dynamic restricted expression of the chaperone Hsc70 in early chick development. *Mech. Devel.* *82*, 199-203.
- Celi, F.S., Negri, C., Tanner, K., Raben, N., De Pablo, F., Rovira, A., Pallardo, L.F., Martín-Vaquero, P., Mitchell, B.D., Stern, M.P., and Shuldiner, A.R. (2000). Molecular scanning for mutations in the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Mexican Americans with type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* *16*, 370-377.
- De la Rosa, E. J., and De Pablo, F. (2000). Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* *23*, 454-458.
- De Pablo, F., Banner, L. R., and Patterson, P.H. (2000). IGF-I expression is decreased in LIF-deficient mice after peripheral nerve injury. *NeuroReports* *11*, 1365-1368.
- Díaz, B., Serna, J., De Pablo, F., and de la Rosa, E.J. (2000). In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* *127*, 1641-1649.
- Pimentel, B., Sanz, C., Varela-Nieto, I., Rapp U.R., De Pablo, F., and de la Rosa, E.J. (2000). C-Raf regulates cell survival and retinal ganglion cell morphogenesis during neurogenesis. *J. Neuroscience* *20*, 3254-3262.
- Sugiura, S., Lahav, R., Han, J., Kou, S-Y, Banner, L.R., De Pablo, F., and Patterson, P.H. (2000). Leukemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 457-466.
- Thomas, G., De Pablo, F., Schlessinger, J., and Moscat, J. (2000). The ins and outs of protein phosphorylation (Meeting report). *EMBO reports* *1*, 11-15.



Departamento de Biología de Plantas
Department of Plant Biology

Jefe de Departamento
Department Head

PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ

Profesores de Investigación

PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ
JOSÉ RAMÓN DÍAZ RUIZ
DIONISIO LÓPEZ ABELLA

Investigadores Científicos

M^a ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ GÓMEZ
M^a CARMEN RISUEÑO ALMEIDA

Científicos Titulares

ISABEL GARCÍA LUQUE
JUAN JOSÉ LÓPEZ-MOYA GÓMEZ
FCO. JAVIER MEDINA DÍAZ
SUSANA MORENO DÍAZ DE LA ESPINA
FÉLIX ORTEGO ALONSO
PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO
M^a TERESA SERRA YOLDI

Personal Técnico

CARLOS ALMARZA SANZ
MERCEDES CARNOTA ROMERO
SONIA CASTILLO LLUYA
NIEVES FONTÚRBEL CABAÑAS
MONSERRAT LLORENTE DE MINGO
M^a LUISA RUIZ SERRA

Secretaría

M^a VICTORIA LAFITA TOGORES

Matriz Nuclear y Regulación de la Organización y Funcionalidad Nuclear

Nuclear Matrix and Regulation of the Nuclear Organisation and Function

SUSANA MORENO DÍAZ DE LA ESPINA

Jefe de Grupo / Group Leader:

MARÍA ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ GÓMEZ

Investigadoras de Carrera / Staff Scientists

M^a JESÚS COCERO OVIEDO (Desde I-2000)

OLGA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ (Hasta VI-2000)

SUSANA FRANCA (Hasta VII-1999)

Investigadoras Visitantes / Visiting Scientists

PING CUI (Desde XI-2000)

Hua Li (Hasta VIII-2000)

B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellows

RICARDO ACEVEDO ROJAS

ELSA ALVERCA (Desde VI-2000)

VERÓNICA DOMÍNGUEZ PLAZA (Desde I-2000)

FERNANDO NOVILLO ZARAGOZA (Hasta III-1999)

RAFAEL SAMANIEGO GARCÍA

B. Predoctorales / Graduate Students

MERCEDES CARNOTA ROMERO

NIEVES FONTÚRBEL CABAÑAS

Personal Técnico / Technicians

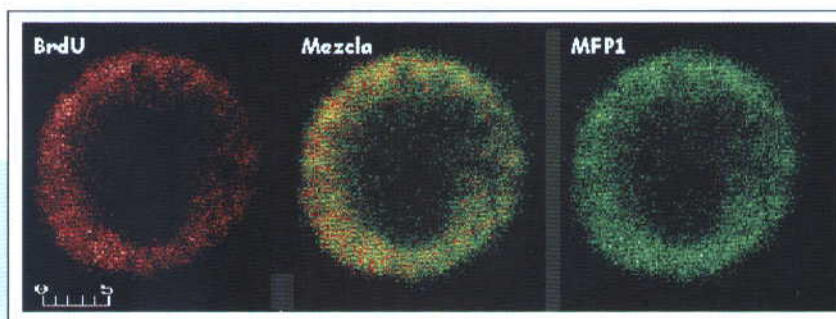


Figura 1: Distribución de la proteína MAR-binding MFP1 y del DNA recién sintetizado después de un pulso de incorporación in vivo de 5-Bromo-2' deoxyuridina, en los complejos pre-replicativos y factorías de replicación de un núcleo de *Allium cepa* en fase S1. La imagen fundida permite distinguir los complejos pre-replicativos (MFP1⁺) de las factorías activas (MFP1⁺/Br⁺).

Figure 1: Distribution of the MAR-binding protein MFP1 and the new-synthesised DNA after an in vivo pulse of 5-Bromo-2' deoxyuridine, in the pre-replicative complexes and replication factories of an S1 *Allium cepa* nuclei. The merge image discriminates the pre-replicative complexes (MFP1⁺) from the active factories (MFP1⁺/Br⁺).

Palabras clave: Matriz nuclear, factorías, replicación, *splicing*, plantas, Dinoflagelados, cromosomas, nucleoesqueleto, transcripción. Embriones ovinos, desarrollo preimplantacional *in vivo* e *in vitro*, criopreservación, ultraestructura

Keywords: Nuclear matrix, factories, replication, *splicing*, plants, Dinoflagellates, chromosomes, nucleoskeleton, transcription. Sheep embryos, *in vivo* and *in vitro* preimplantational development, cryopreservation, ultrastructure

Microarquitectura del nucleoesqueleto y actividades asociadas

The microarchitecture of the nucleoskeleton and attached activities

La matriz nuclear (MN) de plantas consta de una red ramificada de filamentos con estructura periódica, que forman el nucleoesqueleto básico, y agregados densos de tamaño variable correspondientes a los complejos multiméricos asociados. La MN influye en múltiples procesos nucleares como son el mantenimiento de la organización de la cromatina, expresión génica, replicación, etc. Actualmente estamos investigando el papel del nucleoesqueleto en el control del patrón de replicación y en el ensamblaje y funcionalidad de factorías de replicación y *splicing*.

The plant nuclear matrix (NM) consists of a branched network of filaments with periodic structure, which forms the basic nucleoskeleton and dense aggregates corresponding to the attached multimeric complexes. The NM is involved in many nuclear processes as the maintenance of chromatin organization, gene expression, replication, etc. At present we investigate the role of the nucleoskeleton in the control of the replication pattern and in the assembly and function of the replication and *splicing* factories.

La replicación del genoma en eucariotas se produce en el ciclo celular siguiendo un orden estricto temporal y espacial. Tiene lugar en ensamblajes multiméricos conocidos como factorías de replicación (FR), visibles como lugares de incorporación de precursores del DNA (5-Br-2'Udr). Dichas factorías están ancladas a la matriz nuclear y derivan de complejos pre-replicativos. En levaduras y mamíferos, las proteínas se ensamblan secuencialmente en los complejos pre-replicativos y en las FRs, pero no existen datos en plantas. Parece ser que todos los complejos pre-replicativos se ensamblan a la vez, aunque la replicación en orígenes tardíos se vea reprimida hasta el S3, cuando se transforman en FRs. El papel del nucleoesqueleto en estos procesos es desconocido.

DNA replication in eukaryotes takes place during the S period of the cell cycle in multimeric assemblies called replication factories (RF), visible by immunodetection of 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. The RFs are anchored to the NM and are derived from pre-replicative complexes. In yeast and mammalia, the proteins sequentially assemble in pre-replicative complexes and RFs, but there is no available information in plants. Apparently all the pre-replicative complexes assemble at the same time, although the replication in late origins is repressed until its transformation in RFs. The role of the nucleoskeleton in this processes is unknown.

Las células en equilibrio proliferativo de *Allium cepa* muestran diferentes patrones de replicación, con las FRs ancladas a la MN. En poblaciones sincronizadas con HU, caracterizadas por citometría de flujo, hemos demostrado patrones específicos para replicación temprana (S1) y tardía (S3). Para determinar si el ensamblaje y/o el encendido de las FRs están condicionados por su asociación al nucleoesqueleto, analizamos la presencia en los complejos pre-replicativos y FRs, en relación a su activación, de AcMFP1, una proteína que asocia el DNA a la MN (MAR-binding); topoisomerasa IIa; CENP-B, asociada al DNA centromérico de replicación tardía, PCNA, y la subunidad reguladora de la quinasa CDK (que fosforila, entre otras, y así libera la proteína Cdc6 del complejo pre-replicativo, transfor-

Distinct topological patterns of replication were displayed in *Allium cepa* L. root meristems proliferating under steady state kinetics, with RFs anchored to the NM. In cells synchronized by HU treatment, characterized by flow cytometry, we found distinct patterns for early (S1) and late (S3) replication. To determine whether the assembly and/or the firing of RFs are conditioned by association to the nucleoskeleton, we analyzed the presence in the pre-replicative complexes and RFs in relation to its firing, of AcMFP1, a protein involved in DNA association to the NM (MAR-binding), TOPOIIa, CENP-B, a protein of the NM associated to the late replicating centromeric DNA, PCNA, the processivity factor of the DNA polymerases, and the subunits of the CDK (that frees through phosphorylation the Cdc6 protein from the pre-replicative complex transforming it into a RF). We have demonstrated that the association of AcMFP1 to the complexes in

mándolo en FR). Hemos demostrado que la asociación de AcMFP1 a los complejos de la MN es pre-replicative, aunque una posible implicación en reparación post-replicative o maduración del DNA está también en estudio.

El metabolismo del RNA está también organizado espacialmente en asociación al nucleoesqueleto, con una distribución dinámica distinta de la de las FRs. La inmunofluorescencia con anticuerpos contra distintos componentes del spliceosoma demuestra que no sólo la distribución topológica, sino también la composición de los sitios de splicing es dependiente de la actividad nuclear.

Organización nuclear en Dinoflagelados

Los Dinoflagelados son el único phylum de eucariotas sin histonas ni nucleosomas. Poseen características procariotas como la organización primaria del DNA y cromosomas, junto a otras eucariotas como las secuencias repetitivas, la organización de los genes ribosómicos en tandem o la existencia de un mecanismo de splicing del RNA. Para analizar los procesos de expresión génica en estos organismos mantenemos una línea de investigación en colaboración con el laboratorio de Microbiología Experimental del INSA de Lisboa, líder en Biología de Dinoflagelados, que mantiene un banco con cultivos clonales de numerosas especies.

Hemos demostrado la existencia de una matriz nuclear eucariota compleja en Dinoflagelados, con una organización estructural similar a la de vertebrados y plantas. La detección de proteínas que intervienen en la organización de dominios funcionales y estructurales del DNA como las laminas y topoisomerasa II, así como la capacidad de sus proteínas para asociar secuencias MAR heterólogas, indican que el DNA no nucleosómico de Dinoflagelados tendría una organización en lazos de tipo eucariota, demostrando que la organización de la expresión génica en dominios discretos es una adquisición antigua del núcleo eucariota y reafirman la posición taxonómica plenamente eucariota del phylum. El análisis inmunológico del núcleo de varias especies de Dinoflagelados con posiciones taxonómicas muy distantes sugiere que éstos poseen un nucleoplasma de tipo eucariótico con dos dominios topológicos bien definidos: una región pericromosómica donde se produce la transcripción y se acumulan las ribonucleoproteínas y una región intercromosómica rica en proteínas altamente fosforila-

the NM is prereplicative, although as possible involvement in post-replication DNA repair or in DNA maturation is under investigation.

Nuclear RNA metabolism is also spatially ordered in the nucleus by association to the NM, with a dynamic distribution different from that of the RFs. Immunofluorescence with antibodies against components of the spliceosome, reveals that not only the topological distribution, but also the protein composition of the splicing sites depend on nuclear activity.

Nuclear Organization in Dinoflagellates

Dinoflagellates are the only eukaryotic phylum which lacks histones and nucleosomes. They have some prokaryotic features, as are the primary organization of DNA and chromosomes, but others are typical of eukaryotes like the repetitive sequences, organization of the ribosomal genes in tandem, and the existence of a mechanism for RNA splicing. In order to analyse the nuclear organization of the processes of genetic expression in these organisms, we maintain a collaboration with the Laboratory of Experimental Microbiology of the INSA in Lisbon, a leader in Dinoflagellate Biology, which maintains clonal cultures of many species.

We have demonstrated the existence of a complex eukaryotic nuclear matrix in Dinoflagellates, with a similar organization to those of plants and vertebrates, although with slight structural variations correlating with the peculiarities of the nuclear organization in this phylum. The detection of proteins involved in the organization of the functional and structural DNA domains, such as lamins and topoisomerase II, as well as the MAR binding ability demonstrated by the matrices in vitro, indicate that the non-nucleosomic DNA of Dinoflagellates would be organised in eukaryotic loop domains. Our results demonstrate that the organization of the gene expression in domains is an old acquisition of the eukaryotic nucleus, and reinforce the eukaryotic position of Dinoflagellates. The immunological analysis of the nuclei from several Dinoflagellate species with distant taxonomic positions, suggests that their nucleoplasm is typical of eukaryotes, with two well-defined domains: a perichromosomal region of transcription and ribonucleoprotein accumulation, and the interchromosomal region enriched in highly phosphorylated proteins. These results suggest that the organization of the transcription and splicing complexes in Dinoflagellates is eukaryotic, in contrast with other

das. Estos resultados sugieren que la organización básica de los procesos de transcripción y splicing en Dinoflagelados es de tipo eucariota, en contraste con otros phyla de protista que no poseen un patrón conservado de organización nuclear.

Los principales objetivos de esta línea en el presente son: 1) la caracterización del genoma nuclear de estos organismos y la organización de sus cromosomas durante los diferentes períodos del ciclo interfásico y la mitosis intranuclear. 2) caracterización de los complejos de replicación transcripción y splicing y su relación con el nucleoesqueleto. Para ello utilizamos cultivos sincronizados de especies con diferentes características genéticas y un abordaje experimental mediante citometría de flujo, hibridación *in situ* fluorescente (FISH), inmunomarcado para proteínas nucleares y precursores del DNA y RNA bromados. La organización de los cromosomas y complejos de transcripción y splicing y su distribución topológica en el núcleo y nucleoesqueleto se investiga mediante microscopía confocal y electrónica.

Identificación de factores determinantes de la producción y congelación de embriones de pequeños rumiantes, en los distintos estadios preimplantacionales: análisis de las lesiones ultraestructurales inducidas y sus efectos en la viabilidad

La obtención de embriones de alta viabilidad es de interés prioritario para los programas genéticos de conservación de especies amenazadas y ganadería. Para optimizar estas técnicas se requiere determinar la incidencia de los diversos factores implicados en las técnicas de reproducción y cultivo *in vitro*, en los distintos estadios del proceso. En colaboración con el Departamento de Reproducción Animal del INIA, nuestro grupo está analizando las alteraciones que afectan a la organización y ultraestructura celular fina de los embriones cultivados *in vitro*. Para ello se han determinado previamente mediante microscopía electrónica las características de organización y ultraestructura celular de los embriones de más de ocho células hasta el estadio de blasto obtenidos *in vivo* de hembras superovuladas. Estos resultados se compararán posteriormente con las lesiones inducidas por el proceso de congelación y posterior descongelación con distintos crioprotectores. Tras el análisis comparativo de las lesiones se efectúa la correlación con los datos de supervivencia *in vitro* obtenidos en cada caso.

Protist phyla, which do not present a conserved pattern of nuclear organization.

The main objectives of this line at present are: 1) the characterization of the nuclear genome and its organization in chromosomes during the main interphasic periods and the intranuclear mitosis, and 2) the characterization of the replication, transcription and splicing sites and their relationships with the nucleoskeleton. To address these issues, flow cytometry, FISH, immunofluorescence confocal microscopy and feeding with Br-tagged DNA and RNA precursors were applied to synchronized cultures of different Dinoflagellate species. The organization of chromosomes and of the replication and transcription/splicing sites is analyzed by confocal and electron microscopy.

Identification of factors determining embryo production and freezing at different preimplantation stage in small ruminants: analysis of the induced ultrastructural lesions and their influences in embryo viability

The production of embryos with high development rates is a priority in the genetic programs of reproduction of endangered species and in cattle breeding. To improve the efficiency of the techniques of embryo culture and reproduction in vitro, the many factors involved in the different steps of the process need to be determined. In collaboration with the Department of Animal Reproduction of the INIA, our group is investigating the alterations affecting the general organisation and cellular ultrastructure of in vitro-cultured embryos. We have previously established by electron microscopy the organisation and cell ultrastructure of embryos from the state of more than 8 cells to blasts, obtained in vivo from superovulated ewes. These results will be compared with the injuries induced by freezing and later thawing with different cryoprotectants. After the comparative analysis of the lesions, a correlation with the survival rates in vitro for each case is performed.

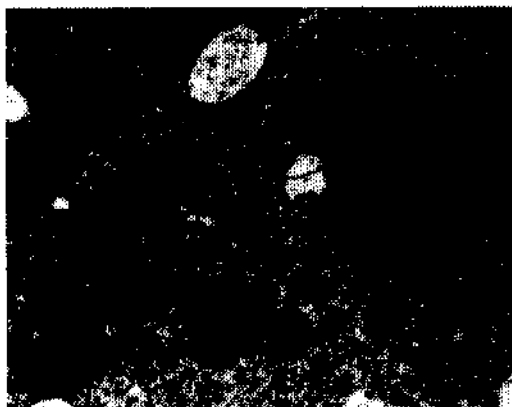


Figura 2: Detalle de la organización ultraestructural citoplásmica de un embrión en estadio de mórula, fijado inmediatamente después de su obtención. Se muestran las mitocondrias típicas de los primeros estadios embrionarios con numerosas conexiones con las cisternas del retículo endoplásmico y abundantes vesículas de endocitosis, todos ellos indicativos del alto metabolismo celular en este estadio.

Figure 2: Detail of the cytoplasmic ultrastructural organization of an embryo in the stage of morula, fixed immediately after extraction. Shown are the typical mitochondria of the first embryonic stages with numerous connections with the endoplasmic reticulum cisternae, and abundant endocytosis vesicles, all of them indicating the high cellular metabolism of this stage.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PB-95-0117 (1997-1999)
- DGICYT, PB96-0909 (1997-1999)
- CSIC/UNAM, (1998-2000)
- CSIC/JNICT, 2000PT00012 (1998-2001)
- AECL, 99CN0008 (1999-2001)
- CSIC/CITMA, 99CU 0010 (1999-2000)
- DGICYT, PB98 -0647 (2000-2002)
- MAPA, SC00-051-C3-3 (2000-2003)

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- **Ricardo Acevedo Rojas.** Organización y función del núcleo celular en el proceso de desarrollo radical de diversos cultivares de caña de azúcar. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Directora: S. Moreno Díaz de la Espina.

Publicaciones/*Publications*

- Echeverría, O., Moreno Díaz de la Espina, S., Jiménez-García, L.F., and Vázquez-Nín, G.H. (1999). Supramolecular organization of RNPs in a Chromocentric Plant Nucleus. *Biol. Cell* 91, 209-219.
- Yu, W. and Moreno Díaz de la Espina, S. (1999). The Plant Nucleoskeleton: Ultrastructural Organization and Identification of NuMA homologues in the nuclear matrix and mitotic spindle of plant cells. *Exp. Cell Res.* 246, 516-526.
- Acevedo, R., Moreno Díaz de la Espina, S., Fernández Gómez, M.E., Cuadrado, A., Jouve, N., de la Torre, C. (2000). Dormancy and proliferation in *S.officinorum* X *S. spontaneum* hybrids differing in the number of the *S. spontaneum* chromosomes. *J. Exp. Bot.* 52, 1-6.
- Bassy, O., Jiménez-García, L.F., Echeverría, O.M., Vázquez-Nín G.H., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2000). High resolution detection of rRNA and rDNA in plant nucleoli with different activities by *in situ* hybridisation. *Biol. Cell.* 92, 59-70.
- Samaniego, R., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2000). Organisation and composition of the plant nuclear matrix. Characterization and subcellular distribution of a MAR-binding protein AcMFP1. *Cell. Biol. Mol. Lett.* 5, 264-266.
- Samaniego, R., Yu, W., Meier, I., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2000). Characterization and high resolution subcellular distribution of a MAR-binding protein (MFP1) in onion proliferating cells. *Planta* 212, 535-546.

Nucleolo de Células Vegetales Plant Cell Nucleolus

FRANCISCO JAVIER MEDINA DÍAZ
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

FRANCISCA LERÍA MOSQUERA
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

FERNANDO GONZÁLEZ CAMACHO (Desde II-2000)
VICTORIA RODRÍGUEZ VILARIÑO (Desde XI-1999)
Becarios Predoctorales / Graduate Students

MERCEDES CARNOTA ROMERO
NIEVES FONTÚRBEL CABAÑAS
Personal Técnico / Technicians

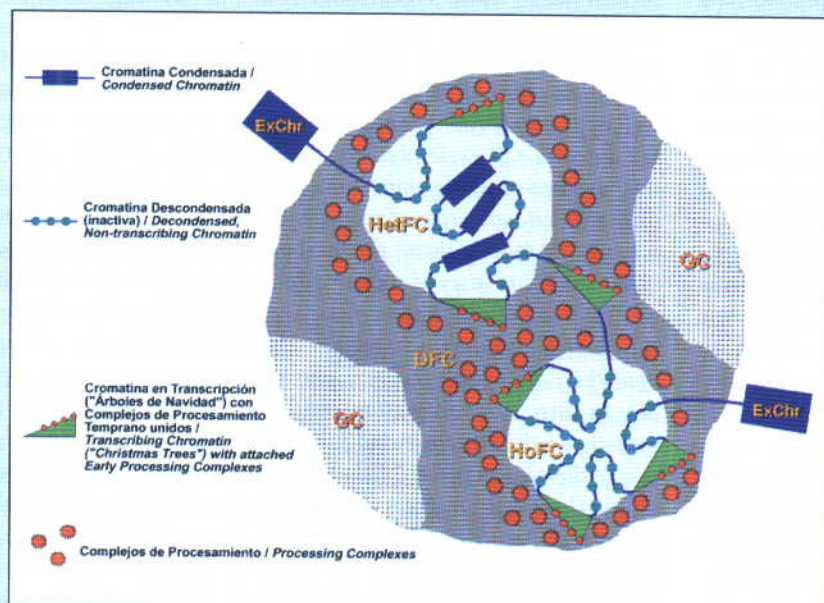


Figura: Representación esquemática de la localización *in situ*, en los componentes estructurales del nucleolo, de los principales complejos moleculares implicados en la transcripción de los genes del rRNA y en el procesamiento temprano del pre-rRNA.

Figure: Schematic representation of the *in situ* localization, in the nucleolar structural components, of the main molecular complexes involved in transcription of rRNA genes and in the early processing of pre-rRNA.

ExChr: Cromatina Extranucleolar / Extranucleolar Chromatin; HoFC: Centro Fibrilar Homogéneo / Homogeneous Fibrillar Center; HetFC: Centro Fibrilar Heterogéneo / Heterogeneous Fibrillar Center; DFC: Componente Fibrilar Denso / Dense Fibrillar Component; GC: Componente Granular / Granular Component.

(Figura publicada en / Figure published in: Eur. J. Histochem. (2000) 44, 117-131).

Palabras clave: Proteínas nucleolares, ciclo celular, biología espacial, cromosomas politénicos, ascidias

Efectos de la microgravedad sobre la biogénesis de los ribosomas y el ciclo celular en células proliferantes de plantas

La capacidad proliferativa de las células produce la existencia del ciclo de división celular. Además, la construcción de nuevo material celular y las actividades necesarias para el mantenimiento del ciclo exigen una activa producción de proteínas y, en consecuencia, de ribosomas, las factorías celulares donde se sintetizan estas macromoléculas. Por esto, la síntesis de los ribosomas se regula en relación con los mecanismos que gobiernan la proliferación y el progreso del ciclo celular.

El estudio de estos mecanismos celulares fundamentales en condiciones de gravedad control y en ambiente de microgravedad es esencial para conseguir el objetivo de la adaptación de los seres vivos a ambientes distintos de aquél en el que se ha producido la evolución. Este es un paso decisivo en el esfuerzo humano por colonizar otros planetas, y está en la base de la construcción de la Estación Espacial Internacional (ISS), la mayor empresa conjunta realizada por todas las Agencias Espaciales del mundo, la cual se encuentra en plena fase de ensamblaje.

En este contexto, nuestro objetivo es conocer cómo las condiciones de microgravedad afectan al desarrollo del ciclo celular en plantas, así como a parámetros significativos de la biogénesis de los ribosomas durante sus distintas fases. Para ello hemos realizado en los últimos años importantes contribuciones al conocimiento de la organización funcional del nucleolo de células proliferantes, la más reciente de las cuales ha sido el establecimiento de los sitios de transcripción y procesamiento temprano en la estructura nucleolar. Además, hemos identificado dos proteínas nucleolares de plantas que presentan una expresión diferencial durante el ciclo celular y son fosforiladas por quinasas reguladoras de la proliferación. En estos momentos investigamos la estructura y función de estas proteínas para utilizarlas como marcadores de las alteraciones inducidas por la microgravedad en estos procesos y pretendemos estudiar la expresión de genes reguladores del ciclo celular en condiciones de gravedad control y de ingravidez. Como preparación a los experimentos espaciales a realizar en la ISS, se llevarán a cabo pruebas en microgravedad simulada, utilizando un clinostato facilitado por la Agencia Espacial Europea (ESA).

Keywords: Nucleolar proteins, cell cycle, space biology, polytene chromosomes, ascidians

Effects of microgravity on ribosome biogenesis and cell cycle in proliferating plant cells

The ability of cells to proliferate produces the existence of the cell division cycle. Moreover, the building of new cellular material and the activities necessary for cycle maintenance demand a great amount of proteins and, consequently, of ribosomes, the cellular factories where these macromolecules are synthesized. For this reason, ribosome synthesis is regulated in relation to the mechanisms governing cell proliferation and cell cycle progression.

The study of these fundamental cell mechanisms in control gravity as well as in microgravity environment, is essential for the objective of the long-term adaptation of living beings to an environment different from that in which evolution has taken place. This is a decisive step in the human struggle to colonize other planets, and it is at the basis of the construction of the International Space Station (ISS), the biggest joint effort to date carried out by Space Agencies all over the world, which is presently in its assembly phase.

In this context, our objective is to know how microgravity conditions affect to the development of the cell cycle in plants, as well as to significant parameters of ribosome biogenesis through the different cell cycle phases. For this purpose, in recent years, we have been making important contributions to the knowledge of the functional organization of the nucleolus of proliferating plant cells. Among them, the most recent one has been the establishment of the sites of transcription and early processing in the nucleolar structure. Furthermore, we have identified two plant cell nucleolar proteins showing differential expression throughout the cell cycle, which are phosphorylated by kinases which act, in turn, as proliferation regulators. We are now trying to investigate the structure and function of these proteins, in order to use them as markers of the alterations induced by microgravity in these cell processes. In addition, we are planning to study the expression of regulatory genes of the cell cycle in normal environments compared to microgravity conditions. As a first step towards the Space experiments to be carried out in the ISS, preliminary tests will be conducted under simulated microgravity, using a clinostat supplied by the European Space Agency (ESA).

Además pretendemos resolver los problemas instrumentales y metodológicos que conlleva la experimentación espacial. Para ello se han realizado sustanciales avances en los procedimientos de fijación del material biológico; la utilización de microondas ha permitido reducir drásticamente la concentración de fijadores tóxicos volátiles sin detrimento de la preservación estructural ni antigénica, y la tecnología del "subcooling" ha sido capaz de mantener por largo tiempo la viabilidad funcional de núcleos aislados. En la actualidad lideramos un "Topical Team" de la ESA dedicado al estudio de estos problemas. Esta Línea de Trabajo se desarrolla en colaboración con el Prof. Roberto Marco, del Depto. de Bioquímica, UAM.

Organización funcional del nucleolo en células politenizadas

Este es un Proyecto iniciado en el año 2.000 en colaboración con el Dr. José Luis Díez, del Dpto. de Biología Celular y del Desarrollo de este Centro.

El punto de partida del Proyecto es el hecho de que el nucleolo es el resultado de la actividad de un segmento del genoma, los genes ribosómicos, constituido por una unidad transcripcional que se repite en tándem cientos o miles de veces. En células politenizadas, como las de las glándulas salivares del díptero *Chironomus*, todo el DNA se encuentra amplificado, constituyendo los cromosomas politénicos; en particular, el resultado de la amplificación de los genes ribosómicos es un nucleolo gigante, que se origina de la expresión de todos estos genes multiplicados, localizados en un único locus cromosómico, el organizador nucleolar (NOR). Pretendemos conocer la organización topológica de las distintas etapas de la biogénesis de los ribosomas en este nucleolo gigante que caracteriza a las células politenizadas, de manera que puedan adscribirse componentes o dominios estructurales subnucleolares concretos a cada una de las etapas funcionales del proceso. Nuestra hipótesis es que la existencia de las mismas especies moleculares y procesos funcionales en el nucleolo gigante que en el nucleolo no amplificado permitirá discriminar con mayor facilidad y con mayor precisión estos distintos dominios estructurales funcionalmente significativos en nuestro modelo biológico, resolviendo así los numerosos problemas pendientes sobre este tema en otros modelos celulares. Los experimentos que estamos desarrollando incluyen técnicas inmunocitoquímicas y de hibridación *in situ*, así como ensayos funcionales de transcripción *in situ* ("run-on"), que se

On the other hand, we attempt to solve the instrumental and methodological problems posed by Space experimentation. With this purpose, we have made substantial achievements in the fixation procedures for biological materials; the use of microwaves has allowed us to drastically reduce the concentration of toxic volatile fixatives, without compromising either the structural or the antigenic preservation, and the subcooling technology has allowed the long-term maintenance of the functional viability of isolated nuclei. At the present time we lead a Topical Team supported by ESA, devoted to these topics. This line of research is developed in co-operation with Prof. Roberto Marco, from the Biochemistry Dept., UAM.

Functional Organization of the Nucleolus in Polytene Cells

This is a project initiated in the year 2000, in co-operation with Dr. José Luis Díez, from the Dept. of Cell and Developmental Biology of this Center.

*The starting point of the project is the fact that the nucleolus is the result of the activity of a genome segment, namely the ribosomal genes, constituted by a transcriptional unit, tandemly repeated hundreds or thousands times. In polytene cells, such as those of the salivary glands of the dipteran *Chironomus*, all the DNA is amplified, forming the polytene chromosomes; in particular, the result of the ribosomal gene amplification is a giant nucleolus, originated from the expression of all these multiplied genes, located in a single chromosomal locus, the nucleolar organizer (NOR). We attempt to know the topological organization of the various steps of ribosome biogenesis in this giant nucleolus featured by polytene cells, in such a way that precise subnucleolar components or structural domains can be attributed to each one of the functional steps of the process. Our hypothesis is that the existence of the same molecular species and functional processes in the giant nucleolus as well as in the unamplified nucleolus, will allow the easier and more precise identification of those functionally significant structural domains in our biological model, thus resolving the numerous problems on this topic which are pending in other cellular models. Experiments in progress include immunocytochemical and *in situ* hybridization techniques, as well as functional assays of *in situ* transcription (run-on), which are visualized under the confocal microscope and the electron microscope. Furthermore, the use of both inhibitors and activators of nucleolar activity is foreseen, with the purpose of*

visualizan a microscopía confocal y microscopía electrónica. También se plantea la utilización de inhibidores y activadores de la actividad nucleolar, con objeto de conocer eventuales modificaciones o redistribuciones de los dominios subnucleolares previamente definidos, asociadas a estos cambios metabólicos.

Estudios morfológicos y detección *in situ* de macromoléculas en ascidias

Esta Línea de Investigación es el objeto de un contrato de colaboración entre el CSIC y la empresa farmacéutica Pharma-Mar, S.A.

El Proyecto tiene por objeto realizar estudios en un organismo marino perteneciente al grupo taxonómico de las Ascidias, en el que la empresa está interesada por ser el productor de una sustancia antitumoral, ET743, que se encuentra en la actualidad en avanzado desarrollo clínico.

El contrato incluye una cláusula de confidencialidad respecto a los resultados de la investigación, por lo que no se pueden incluir aquí detalles de los avances obtenidos

knowing the possible modification or redistribution of the previously identified subnucleolar domains, associated to these metabolic changes.

Morphologic studies and in situ detection of macromolecules in Ascidians

This Research Line is the object of a Contract signed between CSIC and the pharmaceutical company Pharma-Mar, S.A.

The objective of the Project is to perform studies in a marine organism belonging to the taxonomic group of the Ascidians, in which the Company is interested since it is the source of an antitumoral substance, ET743, which is presently in an advanced phase of clinical development.

The Contract includes a confidentiality clause protecting the results of the investigations; for this reason, we are not allowed to provide here details of the achievements obtained.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- CICYT, (PNIE), ESP97-1775 (1997-1999)
- CICYT, (PNIE), ESP1 999-0379-C02-02 (2000-2002)
- DGESIC (PGC), PB98-0470 (2000-2000)
- Convenio CSIC/Academia de Ciencias de Rusia (2000-2000)
- European Space Agency, AO-LS-99-LSS-011-TT (2000-2001)
- PGC, BMC2000-1141 (2000-2003)
- Contrato Empresa Pharma-Mar S.A. (2000-2002)

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- **Francisca Lería Mosquera.** Nuevos métodos de fijación y preservación de material biológico para la investigación espacial. Universidad de Cádiz, 2000. Director: F.J. Medina Díaz.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

- De Cárcer, G., and Medina, F.J. (1999). Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus *J. Struct. Biol.* 128, 139-151.
- Medina, F.J., Cerdido, A., and De Cárcer, G. (2000). The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells (Review). *Eur. J. Histochem.* 44, 117-131.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

- Medina, F.J., Lería, F., Díaz, C., Mateos, J., Mas, J. and Marco, R. (1999). The "Subcooling Technology" as a potentially useful preservation method for biological samples in Space Station scenarios. En: *Utilisation of the International Space Station* A. Wilson (ed.), European Space Agency, ESTEC, Noordwijk (ESA SP-433), pp. 543-548.

Desarrollo de Plantas y Organización Nuclear *Plant Development and Nuclear Organization*

MARÍA-CARMEN RISUEÑO ALMEIDA

Jefe de Grupo / *Group Leader*

PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO

Investigadoras de Carrera / *Staff Scientists*

BEGOÑA FADÓN SALAZAR

Doctor Vinculado / *Associated Scientist*

ADRIANA LATINO FERRAGUT (2000)

MARGARIDA FORTES (III-2000)

OFELIA SAM MOREJÓN (IX-XII/2000)

MARTA SILVA (X-2000)

Investigadoras Visitantes / *Visiting Scientists*

CARMEN RAMÍREZ CASTILLEJO (Desde I-2000)

B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

IVETT BARANY (Desde X-1999)

M^a JOSÉ CORONADO ALBÍ

MERCEDES DÍAZ MENDOZA (Desde IX-1999)

MIGUEL ÁNGEL MORENO (Hasta VI-2000)

JOSÉ M^a SEGUI SIMARRO

B. Predoctorales / *Graduate Students*

CARLOS ALMARZA SANZ

Personal Técnico / *Technician*

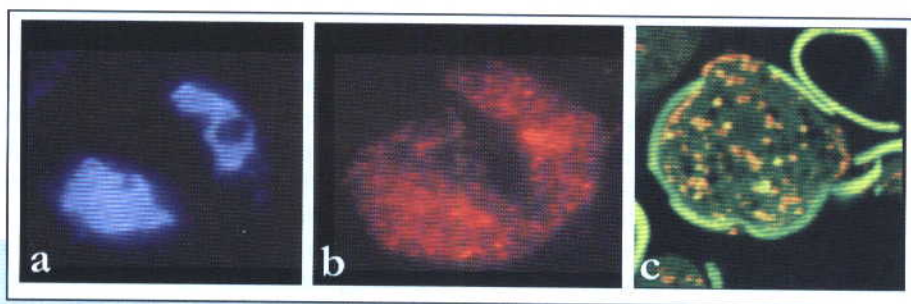


Figura 1: Localización de proteínas de estrés y señalización durante la embriogénesis (a y b) y el desarrollo gametofítico (c) del grano de polen mediante microscopía láser confocal, CLSM. a, b: HSP70 en b, y DAPI de la misma célula en a. c: Colocalización (naranja-amarillo) de MAPK (verde) con elementos de la ruta secretora (rojo).

Figure 1: Localization of stress and signalling proteins during embryogenesis (a, b) and gametophytic development (c) of pollen grain, analyzed by confocal laser scanning microscopy, CSLM. a, b: HSP70 in b, and DAPI of the same cell in a. c: Colocalization (orange-yellow) of MAPK (green) with elements of the secretory pathway (red).

Palabras clave: Polen, embriogénesis, microscopía electrónica, MAP quinasas, desarrollo *in vitro*

Biología celular y fisiología de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés para obtención de haploides

Las plantas dihaploides son utilizadas hoy en día ampliamente en la obtención de líneas isogénicas y nuevas variedades, así como importantes herramientas biotecnológicas en mejora vegetal, además de su utilidad en estudios genéticos y de mutagénesis. La regeneración de estas plantas se realiza fundamentalmente a partir de la inducción de embriogénesis *in vitro* en microsporas y granos de polen.

La microspora cultivada *in vitro*, por la aplicación de un tratamiento de estrés (choque térmico, ayuno, etc) abandona su programa de desarrollo gametofítico para multiplicarse y originar un embrión y, posteriormente, una planta haploide. Aunque se ha conseguido inducir en numerosas especies, el porcentaje de respuesta es en general muy bajo. Estudiamos diferentes aspectos del proceso a nivel celular, comparándolo en diversos sistemas de mono y dicotiledóneas. Abordamos la caracterización celular, por un lado, del desarrollo gametofítico normal y de la fase de desarrollo que es capaz de responder al estrés, la microspora vacuolada, y por otro la progresión del cultivo antes y después de la inducción. Concretamente se estudian: a) Cambios ultraestructurales en los dominios funcionales del núcleo, en relación a la actividad, así como la dinámica de compartimentos citoplásmicos y formación de paredes celulares; b) Localización *in situ* y traslocaciones subcelulares de antígenos implicados en la función nuclear; c) Expresión *in situ* de genes característicos de la embriogénesis, que se están aislando e identificando muy recientemente en diferentes especies; d) Progresión del ciclo celular en ambos programas de desarrollo, estudiando la dinámica de sus fases y presencia y distribución de elementos reguladores del mismo

Proteínas de señalización y estrés durante procesos de desarrollo, embriogénesis y proliferación en plantas: Expresión y localización *in situ*

En muchos eucariotas se han identificado numerosos elementos de rutas de transducción de señales implicadas en la entrada en proliferación o en cambios de programas de desa-

Keywords: Pollen, embryogenesis, electron microscopy, MAP kinases, *in vitro* development

Cell biology and physiology of stress-induced microspore embryogenesis to obtain haploids

Nowadays, di-haploid plants are widely used to obtain isogenic lines and new varieties, and also used as important biotechnological tools in plant breeding; and they are also very useful in genetic studies. Regeneration of di-haploid plants is mainly obtained from *in vitro* embryogenesis induction in microspores and pollen grains. When a stress treatment (heat-shock, starvation...) is applied to the microspore *in vitro*, it changes its gametophytic developmental program to form a haploid embryo and, thereafter, a haploid plant. Even though, pollen embryogenesis has been induced in many plant species, the response is still very low. We have studied different aspects of this process at cellular level, and we compared results in mono and dicot plants. We performed the cellular characterization of normal gametophytic development and the developmental stage in which the microspore is responsive to the stress treatment, the stage of late vacuolate microspore, and, also during *in vitro* culture progression, before and after the induction. Specifically, we studied: a) Ultrastructural changes in the functional domains of the nucleus in relation to activity, as well as the dynamics of cytoplasmic compartments and cell wall formation, b) *In situ* localization and subcellular translocations of antigens involved in nuclear functions. c) *In situ* expression of embryogenesis characteristic genes, which are very recently isolated and identified in different species. d) Cell cycle progression in both developmental programs, by studying the dynamics of cell cycle periods and the presence and distribution of regulatory elements.

Signalling and stress proteins during plant development, embryogenesis and proliferation: *in situ* expression and localization

In many eukaryotes, numerous elements of signal transduction pathways involved in the entry in proliferation and changes in developmental programs have been identified. Homologous elements have been found in plants, but their functions are largely unknown. Molecular studies suggest that during the induction of microspore embryogenesis, signal transduction pathways,

rollo. En plantas, se han encontrado elementos homólogos, aunque se conoce poco sobre su función. Los datos moleculares apuntan que durante la inducción de embriogénesis en la microspora operan rutas de transducción de señales homólogas a las encontradas en otros eucariotas, en las que están involucrados módulos de MAPK ("Mitogen Activated Protein" quinasas). Estudios del grupo han revelado por primera vez la localización ultraestructural de la proteína y los transcritos de un gen homólogo a MAPK aislado en tabaco, y los cambios de expresión y localización en células vegetales quiescentes y en proliferación.

Por otra parte, las proteínas de choque térmico ("Heat shock proteins", HSPs) son una de las clases más abundantes de proteínas de estrés en plantas, cuya expresión además se ha relacionado también con procesos de desarrollo. Algunos de los tratamientos de estrés más efectivos para inducir la embriogénesis de microsporas consisten en un choque térmico. Aunque los tratamientos inductores difieren según las especies, los datos hasta ahora obtenidos indican que la expresión de genes de estrés está involucrada en todas ellas. En el grupo analizamos la presencia, distribución subcelular, expresión *in vitro* y traslocación de elementos relacionados con la respuesta a estrés y transducción de señales, como las proteínas de choque térmico (HSPs), las MAP quinasas, y elementos de sus cascadas. Los primeros resultados obtenidos en el grano de polen durante su desarrollo gametofítico y embriogénesis *in vitro* revelan cambios en la expresión y localización de varios elementos de estos grupos de proteínas, indicando que las HSPs juegan un papel clave en estos procesos durante los cuales, además operan módulos de MAP quinasas.

Dominios funcionales del núcleo celular relacionados con rutas de señalización en plantas

La dinámica de los dominios funcionales y estructurales del núcleo en células vegetales (cromatina condensada, región inter-cromatínica y nucleolo) está relacionada con las funciones de replicación, transcripción, procesamiento y transporte de RNAs, variando su organización estructural en relación a esta actividad y en las diferentes etapas del desarrollo gametofítico y embriogénico, así como durante las distintas fases del ciclo celular. El grupo ha estudiado durante años los cambios a nivel subcelular y ultraestructural en los patrones de localización de diferentes macromoléculas implicadas en la síntesis y procesamiento de DNA y RNA heterogéneo y ribosómico, empleando marcadores

homologous to those found in other eukaryotes, are operating. In these pathways, mitogen-activated protein kinases, MAPKs, are involved. Studies of the group have revealed for the first time the ultrastructural localization of the protein and transcripts of a MAPK-homologous gene in tobacco, and its changes in expression and localization in quiescent and proliferating plant cells.

On the other hand, the heat-shock proteins, HSPs, are one of the most abundant class of stress proteins in plants, their expression has been also related to developmental processes. Some of the more efficient treatments for microspore embryogenesis induction are heat-shocks. Inductive treatments vary among species, but different data indicate that stress gene expression is involved in all of them. The presence, subcellular distribution, in situ expression and translocations of elements related to stress response and signal transduction, as HSPs and MAPKs, being analyzed by our group. The first results of the pollen grain during its gametophytic development and embryogenesis induction in vitro show changes in the expression and localization of various elements belonging to these groups of proteins, suggesting that HSPs are playing a key role in those developmental processes. MAPKs modules are also operating in them.

Nuclear functional domains related to signalling pathways in plants

Dynamics of the functional and structural domains of plant cell nucleus (condensed chromatin, interchromatin region, and nucleolus) is related to replication, transcription, and RNA processing and transport activities. Their structural organization varies in relation to these activities and during different stages of gametophytic and embryogenic development, as well as during cell cycle phases. For years, our group has studied the changes, at subcellular and ultrastructural levels, in the localization patterns of different macromolecules involved in DNA, hnRNA and rRNA synthesis and processing, by using markers of these processes. Recently, elements of signal transduction pathways have been localized in the nucleus of animal cells. Our studies have revealed that in plants, changes in the nuclear and cytoplasmic localization of MAPKs and other signalling molecules occur during stress response and developmental program changes. Double labelling studies in combination with ultrastructural cytochemistry point out the association of various signalling factors to elements of the nuclear machinery, these findings define

de estos procesos. Más recientemente se han localizado elementos de diferentes rutas de señalización en el núcleo de células animales. Nuestros estudios han revelado que en plantas se producen cambios en la localización nuclear y citoplásmica de MAPKs y otras proteínas de señalización durante procesos de respuesta a estrés o cambios de programa de desarrollo. Estudios de doble inmunomarcado en combinación con citoquímicas ultraestructurales indican la asociación de factores de señalización a diversos elementos de la maquinaria nuclear, definiendo nuevos dominios estructurales y funcionales en el núcleo asociados a rutas de señalización.

Desarrollo y optimización de técnicas para estudios de identificación molecular *in situ* para microscopía correlativa

La microscopía correlativa implica el empleo de abordajes experimentales que permitan visualizar la misma muestra a nivel de microscopía óptica y electrónica. En el grupo se desarrollan técnicas y abordajes para relacionar la información complementaria que se obtiene con el uso de diferentes microscopías, óptica, láser confocal (CLSM) y electrónica. Esta línea de trabajo implica varios estudios: a) Optimización de técnicas de procesamiento en frío (criotécnicas) de muestras biológicas, imprescindibles para localizaciones *in situ* (inmunomarcados, hibridaciones *in situ*, etc). Estas técnicas conservan la reactividad química y antigénica de la muestra, preservando la estructura más cerca del estado *in vivo* y minimizando la pérdida de componentes. El grupo es pionero en el desarrollo de estas técnicas en plantas, particularmente la criofijación, crioultramicrotomía, criosustitución y crioinclusión en resinas tipo Lowicryl. b) Desarrollo de métodos que combinan técnicas citoquímicas específicas para ácidos nucleicos y proteínas con inmunomarcados y otras técnicas de localización *in situ*; la combinación de ambos procedimientos en la misma muestra proporciona una doble información: la naturaleza química de la estructura y la localización precisa del antígeno por la partícula de oro coloidal. c) Técnicas de localización *in situ* empleando sondas y anticuerpos con alta sensibilidad, para detectar pequeñas cantidades de dianas moleculares en la célula y combinando distintos métodos de visualización con fluorocromos, nano-oro y métodos de amplificación de señales, evaluando el resultado en distintas microscopías, láser confocal, de fluorescencia con cámara CCD, y microscopía electrónica de transmisión.

new structural and functional domains associated with signalling pathways in the nucleus.

Development and set up of techniques for *in situ* molecular identification and correlative microscopy

*Correlative microscopy involves the use of experimental approaches for the visualization of the same sample at both light and electron microscopy levels. In the group, approaches and techniques to reveal the complementary information gained by the use of different microscopies, light, confocal (CLSM) and electron microscopy, are developed. This topic involves various research subjects: a) Optimization of low temperature methods for processing biological samples (cryotechniques), which are necessary for *in situ* localizations (immunolabelling, *in situ* hybridization, etc). These low temperature techniques keep the chemical and antigenic reactivity of the sample, maintain the structure nearer the *in vivo* state, and minimize the loss of components. The group is a pioneer in the development of these techniques in plants, specifically cryofixation, cryoultramicrotomy, freeze-substitution, and cryo-embedding in Lowicryl resins. b) Development of methods which combine specific cytochemical techniques for nucleic acids and proteins with immunolabelling and other *in situ* localization techniques. The combination of both procedures in the same sample provides double information: the chemical nature of the structure specifically stained, and the precise localization of the antigen by the gold particle. c) *In situ* localization techniques of high sensitivity, using probes and antibodies for detecting low amounts of molecular targets in the cell. We studied the combination of different detection methods using fluorochromes, ultrasmall colloidal gold particles, and methods to amplify signals, and evaluate the results.*

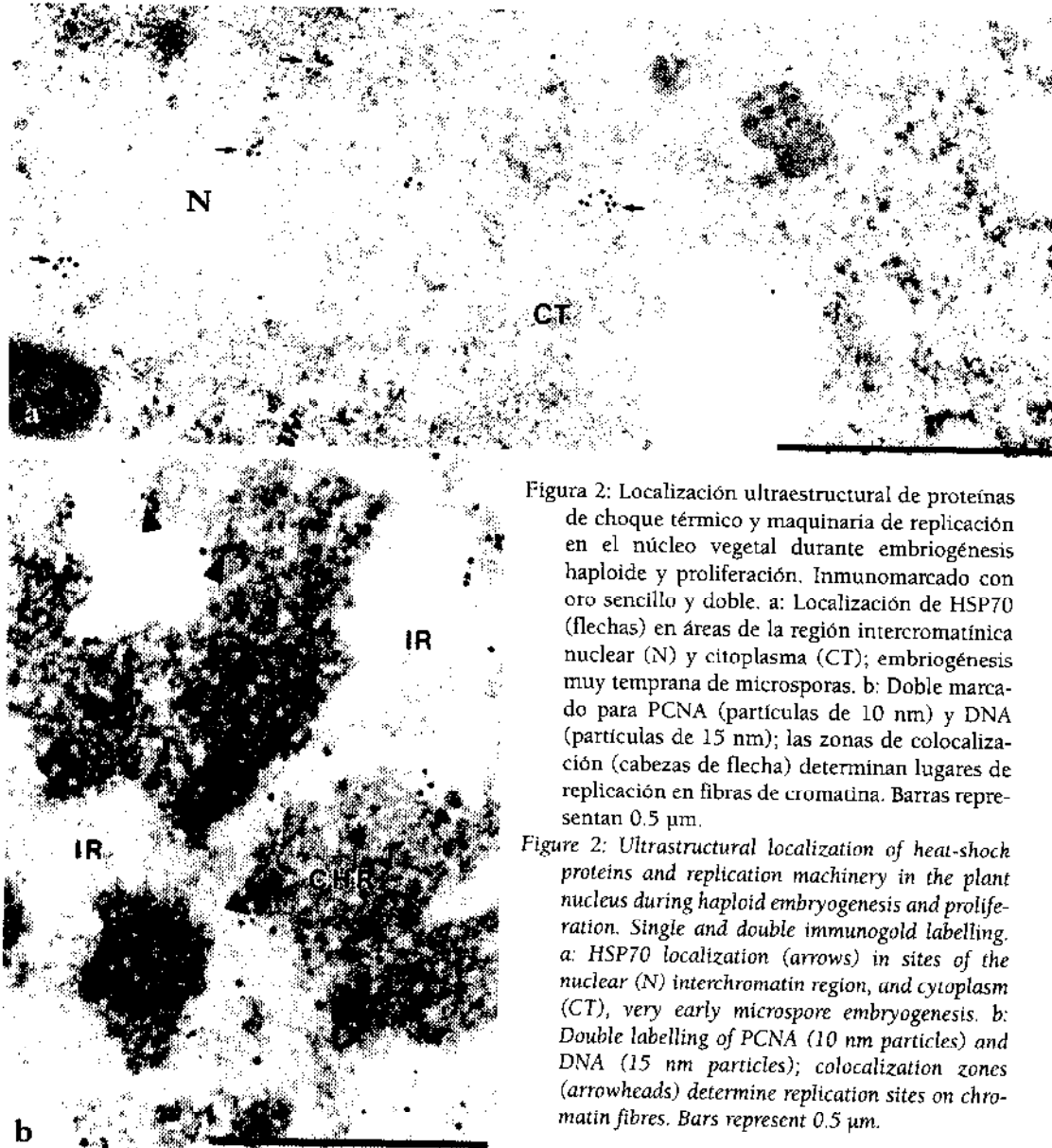


Figura 2: Localización ultraestructural de proteínas de choque térmico y maquinaria de replicación en el núcleo vegetal durante embriogénesis haploide y proliferación. Inmunomarcado con oro sencillo y doble. a: Localización de HSP70 (flechas) en áreas de la región intercromatina nuclear (N) y citoplasma (CT); embriogénesis muy temprana de microsporas. b: Doble marcado para PCNA (partículas de 10 nm) y DNA (partículas de 15 nm); las zonas de colocalización (cabezas de flecha) determinan lugares de replicación en fibras de cromatina. Barras representan 0.5 μ m.

Figure 2: Ultrastructural localization of heat-shock proteins and replication machinery in the plant nucleus during haploid embryogenesis and proliferation. Single and double immunogold labelling. a: HSP70 localization (arrows) in sites of the nuclear (N) interchromatin region, and cytoplasm (CT), very early microspore embryogenesis. b: Double labelling of PCNA (10 nm particles) and DNA (15 nm particles); colocalization zones (arrowheads) determine replication sites on chromatin fibres. Bars represent 0.5 μ m.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGEISIC, PB95-0133 (1996-1999)
- UE, BIO4-CT-0275 (1996-2000)
- DGEISIC-INIA, SC98-081 (1998-2001)
- DGEISIC, PB98-0678 (1999-2002)
- CAM, 07B/0028/1998 (1999-2000)

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

- Préstamo, G., Testillano, P.S., Vicente, O., González-Melendi, P., Coronado, M.J., Wilson, C., Heberle-Bors, E., and Risueño, M.C. (1999). Ultrastructural distribution of a MAP kinase homologue and their transcripts in quiescent and cycling plant cells, and in pollen grains. *J. Cell Sci* 112, 1065-1076.
- González-Melendi, P., Testillano, P.S., Fadón, B., and Risueño, M.C. (2000). Immunoelectron microscopy of PCNA as an efficient marker for studying replication times and sites during pollen development. *Chromosoma* 109, 397-409.
- Magnard, J.L., Le Deunff, E., Domenech, J., Rogowsky, P.M., Testillano, P.S., Rougier, M., Risueño, M.C., Vergne, P., Dumas, C. (2000). Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize. *Plant Mol. Biol.* 44, 559-574.
- Testillano, P.S., Coronado, M.J., Seguí, J.M., Domenech, J., González-Melendi, P., Raska, I., Risueño, M.C. (2000). Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *J. Struct. Biol.* 129, 223-232.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

- Risueño, M.C., Seguí, J.M., Coronado, M.J., Domenech, J., Préstamo, G., González-Melendi, P., Testillano, P.S. (2000). Microspore switch to embryogenesis involves defined changes in the ultrastructure organization. En: *Electron Microscopy*. (Eds.) Frank, L., Cianpor, F. pp. 133-136. Czech Soc. EM Publishing.
- Testillano, P.S., Coronado, M.J., Seguí, J.M., Vicente, O., Risueño, M.C. (2000). *In situ* localization and expression of MAP kinases during pollen development, embryogenesis and cell proliferation. En: *Electron Microscopy*. (Eds.) Frank, L., Cianpor, F. pp. 123-126. Czech Soc. EM Publishing.

Patogénesis de Virus de Plantas y Mecanismos de Resistencia en Plantas

Plant Viral Pathogenesis and Plant Defence Mechanisms

M^a TERESA SERRA YOLDI
Jefe de Grupo / *Group Leader*
ISABEL GARCÍA LUQUE
Investigadoras de Carrera / *Staff Scientists*

PATRICIA GILARDI NAVARRO
M^a ANGELES GUEVARA MORATO (Desde I-1999)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

MYRIAM MORENO GALDEANO (Desde III-2000)
ARÁNZAZU MORENO LOZANO (Desde IX-2000)
MARGARITA RUÍZ DEL PINO (Desde X-1999)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

SONIA CASTILLO LLUYA (Hasta VII-1999)
MONSERRAT LLORENTE DE MINGO
Personal Técnico / *Technicians*

Palabras clave: Patogénesis viral, resistencia vegetal

Mecanismos de resistencia vegetal frente a las infecciones virales

El interés de nuestro trabajo se centra en el estudio de los mecanismos de defensa de las plantas, que conllevan a la restricción del agente patógeno a los lugares de entrada, evitando su diseminación al resto de la planta. Para ello, utilizamos como sistema modelo plantas del género *Capsicum* resistentes a los tobamovirus, donde llevamos a cabo la identificación de los factores virales responsables de la inducción de la respuesta de defensa, así como la caracterización de dicha respuesta.

Hemos determinado mediante la construcción de transcritos virales quiméricos y la expresión transitoria en hojas -por bombardeo con microproyectiles- que las proteínas de cubierta funcionales del virus del moteado suave de la paprika (PaMMV) y del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) son los factores virales requeridos para la induc-

Keywords: Plant virus pathogenesis, plant resistance mechanisms

Plant defence mechanisms against virus infection

*The general aim of our work is to study plant defence mechanism(s) against virus infection, that lead to the restriction of the pathogen to the entry sites, limiting the further viral spread to other parts of the plant. As model system, we use tobamovirus-resistant *Capsicum* spp. In this system, we carry out, from the pathogen side the identification of the viral factors required for eliciting the host response; and from the host side, the characterization of the response during the activation of the resistance mechanism(s).*

By constructing chimeric viruses and by expressing transiently viral genes, we have established that the tobamovirus coat protein acts as the viral elicitor of the L², L¹ and L⁰ gene-mediated defences. This resistance (HR, hypersensitive reaction) is characterized by the activation of the programmed cell death and defence-related genes. It results in the restriction of the viral infection to the primary infection sites and the development of

ción de la reacción de defensa mediada por los 3 genes de resistencia L^2 , L^1 , y L^* . Esta resistencia (reacción hipersensible, HR) -caracterizada por la activación de la muerte celular programada y de genes involucrados en la defensa vegetal- resulta en la restricción de la infección viral a los lugares de infección primaria.

Actualmente estamos caracterizando las proteínas y mRNAs cuya expresión se modifica durante la activación de la HR, a fin de identificar los genes del huésped que están involucrados en la resistencia frente a agentes patógenos, con vistas a su utilización en programas de mejora genética vegetal.

Alternativamente, exploramos la posibilidad de utilizar la expresión constitutiva en las plantas de secuencias derivadas del patógeno para restringir y/o suprimir la replicación viral en aquellos cultivos en los que no existen fuentes de resistencia naturales o bien no se pueden utilizar por las limitaciones de los cruces genéticos. La sobreexpresión en la célula de genes del patógeno alterados darían lugar a productos génicos no funcionales que podrían competir con el producto de expresión viral, y al actuar como genes dominantes negativos, impedirían la infección. Hemos utilizado esta estrategia para obtener plantas resistentes a las infecciones virales, mediante la expresión constitutiva en plantas de *Nicotiana* de mutantes no funcionales de la proteína de movimiento del virus del mosaico del pepino (CMV) para bloquear el proceso del movimiento de célula-a-célula viral. Los ensayos llevados a cabo con diez construcciones diferentes han mostrado que algunas de las líneas de plantas transgénicas con cada una de dichas construcciones reducen la acumulación de CMV con distinta eficacia, inhibiendo el movimiento a corta y/o a larga distancia.

Mecanismos de patogénesis viral

El interés de nuestro trabajo se centra en el estudio de la patogénesis viral, analizando el efecto de la infección viral sobre la fotosíntesis y de los factores virales involucrados. Usando como sistema huésped-patógeno modelo *Nicotiana-tobamovirus*, hemos establecido que la infección viral produce una inhibición selectiva de las isoformas de las proteínas extrínsecas del Fot II, implicadas en el sistema de oxidación/fotólisis del agua. La tasa de inhibición es dependiente de la cepa viral y ocurre transcripcionalmente.

necrotic local lesions.

Alternatively, we are exploring the possibility of using the constitutive expression of pathogen-derived sequences in plants in order to restrict and/or suppress viral replication in susceptible crops to pathogen infection. The overexpression in the cell of dysfunctional pathogen gene products would lead to the blockage of infection, due to the competition of these products with the correspondent viral factors. We are applying this approach to obtain resistant plants against viral infection by expressing dysfunctional deletion mutants of the cell-to-cell movement protein (3a protein) of cucumber mosaic virus (CMV). In these plants the cell-to-cell movement function should be presumably inhibited. Data have shown that plants expressing ten different constructs exhibit a reduction in the accumulation levels of both homologous (CMV) and heterologous (tobacco mosaic virus) viruses, due to an inhibition of the cell-to-cell and long-distance viral movements.

Plant virus pathogenesis

*We are studying the viral pathogenesis mechanisms, focused towards the elucidation of the effect upon photosynthesis. Using as plant-pathogen model system *Nicotiana-tobamovirus*, we have established that viral infection leads to a selective inhibition of certain isoforms of photosystem II extrinsic proteins, involved in water-splitting. The inhibition rate is dependent upon the viral strain and it takes place at the transcriptional level.*

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, 07B/0034/97 (1998-1999)
- CICYT, BIO98-0860-C02-01 (1998-2001)
- Western Seed España SA. (1999-2001)
- CAM, 07B/0043/1999 (2000-2000)
- CAM/CSIC (2000-2004)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Patricia Gilardi Navarro.** Análisis de los inductores virales de la resistencia frente a tobamovirus en el género *Capsicum*. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Directora: M^a Teresa Serra Yoldi.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- García-Luque, I. (1999). Comentarios a la Bibliografía Internacional Virología 6, 23-24.
- Rahoutei, J., Barón, M., García-Luque, I., Droppa, M., Nemenyi, A., and Hórvath, G. (1999). Effect of tobamovirus infection on the thermoluminescence characteristics of chloroplasts from infected plants *Z. Naturforsch* 54, 634-639.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., and Barón, M. (2000). Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol. Plantarum* 110, 286-292.
- Sanz, A.I., Serra, M.T., and García-Luque, I. (2000). Altered local and systemic spread of a movement deficient virus in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus 3a protein. *Arch. Virol.* 145, 2387-2401.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Gilardi, P., Wicke, B., Castillo, S., de la Cruz, A., Serra, M.T., and García-Luque, I. (1999). Resistance in *Capsicum* spp. against the tobamoviruses. En: *Recent Research Developments in Virology* 1, pp. 547-558 S.G. Pandalai. (Ed.) Transworld Research Network.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., Cremona, V., and Barón, M. (1999). Effect of tobamovirus infection on PSII complex of infected plants. En: *Photosynthesis: Mechanisms and effects*. Vol. IV, pp 2761-2764. G. Garab. (Ed.) Kluwer Academic Publisher.

Virología Molecular de Plantas

Plant Molecular Virology

Grupo1 / Group 1

JOSÉ RAMÓN DÍAZ RUIZ
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

FRANCISCO TENLLADO PERALO (Desde VI-1999)
Investigador Contratado / Research Associate

FÉLIX ALEJANDRO ATENCIO
DANIEL BARAJAS RAMÍREZ (Desde XI-1999)
PABLO GONZÁLEZ JARA
B. Predoctorales / Graduate Students

Grupo2 / Group 2

DIONISIO LÓPEZ ABELLA
Jefe de Grupo / Group Leader
JUAN JOSÉ LÓPEZ-MOYA GÓMEZ (Desde VIII-2000)
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

CÉSAR LLAVE CORREAS (Hasta XII-1999)
BELÉN MARTÍNEZ GARCÍA
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

VIRGINIA RUIZ FERRER (Desde I-1999)
B. Predoctoral / Graduate Student

Grupos/Groups 1 y 2

MONSERRAT LLORENTE DE MINGO
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Virus vegetales, transmisión por pulgones, resistencia transgénica, silenciamiento génico, control de enfermedad

Silenciamiento génico y resistencia transgénica a virus

Numerosas secuencias de genes, derivadas de muchos virus de plantas diferentes, se han introducido en una gran variedad de especies de plantas, para producir plantas transgénicas protegidas frente a la infección por estos virus, una estrategia conocida como resistencia transgénica derivada del patógeno. En muchos casos, se sabe que el mecanismo de la resistencia es un proceso posttranscripcional, mediado por RNA, que señala, de una forma específica de secuencia, tanto al RNA viral como al mRNA del transgén, para su degradación.

Esta resistencia a virus mediada por RNA es una manifestación del silenciamiento génico posttranscripcional (PTGS), un potente mecanismo de degradación intracelular de RNA que probablemente ha evolucionado como una defensa de las plantas frente a infecciones virales. PTGS tiene lugar también en plantas no transgénicas pero los virus contraatacan esta respuesta de defensa natural del huésped codificando en sus genomas supresores de PTGS. Esto parece ser una estrategia

Keywords: Plant viruses, aphid transmission, transgenic resistance, genesilencing disease control

Gene silencing and transgenic resistance to viruses

Gene sequences derived from many different plant viruses have been introduced into a wide variety of plant species to produce transgenic plants protected against virus infection, a strategy known as pathogen-derived transgenic resistance. In many cases, it is known that the mechanism of the resistance is a posttranscriptional, RNA-mediated process that targets both the viral RNA and the transgene mRNA for degradation in a sequence-specific manner.

This RNA-mediated virus resistance is a manifestation of posttranscriptional gene silencing (PTGS), a powerful, intracellular RNA-degradation mechanism, which has probably evolved as a plant defense against virus infection. PTGS also takes place in nontransgenic plants but viruses counteract the natural host defense response by encoding suppressors of PTGS in their genomes. This seems to be a widespread strategy used by RNA and DNA viruses of plants.

Along this line, our group maintains a research program, over the last years, focused toward the plant virus disease control. Recently, the emphasis has been on: 1) the analysis of pathogen-

ampliamente distribuida y usada por los virus de plantas tanto RNA como DNA.

En esta línea, nuestro grupo mantiene, durante los últimos años, un programa de investigación orientado hacia el control de enfermedades virales en plantas. Recientemente, el énfasis se ha puesto en: 1) el análisis de estrategias de resistencia transgénica a virus en plantas, derivada del patógeno, y la elucidación de los mecanismos celulares y moleculares que controlan la resistencia y 2) el análisis del mecanismo de defensa antiviral en plantas mediado por silenciamiento génico y el estudio de los supresores virales de silenciamiento génico.

Transmisión de virus por vectores

La transmisión de virus vegetales por insectos vectores es el medio de difusión habitual en la naturaleza. Al tratarse de un proceso esencial en el ciclo de numerosas patógenos, la posibilidad de interferir en la transmisión sería un medio muy eficaz de control de enfermedades causadas por virus.

Entre los diferentes grupos de virus de plantas destacan los potyvirus, que constituyen la familia más numerosa de virus. Los potyvirus afectan a una extensa variedad de cultivos agrícolas de gran importancia económica. En la naturaleza son transmitidos por pulgones de forma no persistente, lo que significa que los virus se asocian externamente y durante periodos breves de tiempo con lugares específicos en el canal alimenticio del pulgón.

No se conoce sin embargo el mecanismo que regula la transmisión por pulgones de los potyvirus. Se sabe que en la transmisión intervienen dos proteínas virales: la proteína de la capsida (CP) junto con una proteína no estructural codificada por el genoma viral, conocida como factor de transmisión o componente helper (HC).

Una hipótesis sobre la función de estas proteínas en la transmisión es que el HC actúa regulando la interacción entre la partícula viral a través de la CP y el canal alimenticio del pulgón, donde podrían existir receptores específicos.

Nuestras líneas de trabajo se enfocan, principalmente, al conocimiento de los mecanismos de transmisión con los siguientes objetivos:

Caracterización molecular de la proteína de la capsida de la partícula viral (CP) y la proteína componente helper

derived, transgenic resistance strategies to viruses in plants and the elucidation of the cellular and molecular mechanisms controlling resistance and 2) the analysis of the gene silencing-mediated antiviral defense mechanism in plants and the study of viral suppressors of gene silencing.

Viral transmission by vectors

Transmission by insect vectors is the most common way of diffusion of plant viruses in nature. Because transmission is an essential process in the cycle of numerous pathogens, the possibility of interference could be a very efficient control measure of diseases caused by viruses.

Among the different groups of plant viruses, Potyviruses constitute the most numerous family of viruses. They infect most economically important crops. Potyviruses are naturally transmitted by aphids in a non persistent manner. This means that these viruses are externally associated during short periods with the cuticular linings of the mouthparts or alimentary tract of the aphid. The mechanism that governs the transmission process of potyvirus by aphids are still poorly understood. So far, two virus-encoded proteins are known to be involved in the transmission process: the coat protein (CP) and a nonstructural viral protein known as helper component (HC).

A current hypothesis about the role of those proteins during transmission suggests that the function of the HC is to facilitate the virions retention with the cuticle of the food canal in the aphids, where specific receptors might exist.

Our current studies are focused mainly on the following areas of the mechanisms of transmission:

Molecular analysis of the coat protein (CP) and the helper component (HC) of Spanish isolates of potato virus Y (PVY) and plum pox virus (PPV) Spanish isolates, among other potyviruses, and identification of the protein domains involved in the transmission process.

Interactions in vitro between the helper (HC) with the virions, and identification of the putative retention sites in the aphid mouthparts.

Obtention of transgenic plants expressing nonstructural virus genes (HC) with the possibility to interfere with infection or transmission processes.

Evaluations of methods to detect potyvirus, including detection in the vector to follow the presence of the virus along the

(HC) de aislados españoles del virus Y de la patata (PVY) y del virus de la Sharka de los frutales de hueso, plum pox virus (PPV), entre otros potyvirus, buscando caracterizar los dominios implicados en transmisión.

Ensayos *in vitro* de interacciones entre el componente helper (HC) y la capsida viral (CP), así como la identificación de los posibles lugares de retención en el pulgón.

Obtención de plantas transgénicas para el gen no estructural HC, con posible interferencia en los procesos de infección o transmisión.

Evaluación de métodos de detección de potyvirus, incluyendo detección en el vector para el seguimiento durante el proceso de transmisión.

Desarrollo de estrategias de control de virosis mediante el diseño de moléculas capaces de interferir en el proceso de transmisión.

transmission process.

Development of virus control strategies based on the design of molecules capable to interfere during the transmission process.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CMA, 07B/0024/1997 (1997-1999)
- PN I+D, BIO97-0615-C02-01 (1997-2000)
- PN I+D, BIO98-0849 (1998-2001)
- CMA, 07B/0026/1999 (2000-2001)
- PN I+D, BIO2000-0914 (2000-2003)
- PN I+D, BIO2000-1605-C02-02 (2000-2002)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Llave Correa, Cesar.** Análisis molecular de los mecanismos de transmisión de potyvirus por pulgones. Universidad Complutense de Madrid 1999. Director: López Abella, Dionisio
- **Martínez García, Belén.** Análisis molecular de las proteínas virales implicadas en la transmisión por pulgones del virus de la Sharka (*plum pox virus*). Universidad Complutense de Madrid 2000. Director: López Abella, Dionisio

Patentes/Patents

- Fernández Fernández, M.R., López-Moya, J.J., and García, J.A. (1999). DNA recombinante derivado del virus de la Sharka y vector de expresión de proteínas heterólogas basado en dicho DNA recombinante. 9900698

Publicaciones/Publications**Artículos en Revistas/Journal Articles**

- Guo, H.S., López-Moya, J.J., and García, J.A. (1999). Mitotic stability of infection-induced resistance to plum pox potyvirus associated with transgene silencing and DNA methylation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 103-111.
- López-Moya, J.J., Fernández-Fernández, M.R., Cambra, M., and García, J.A. (1999). Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* 76, 121-136.
- López-Moya, J.J., Wang, R.Y., and Pirone, T.P. (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *Journal of General Virology* 80, 3281-3288.
- Llave, C., Martínez, B., Díaz-Ruiz, J.R., and López-Abella, D. (1999). Helper component mutations in nonconserved residues associated with the aphids transmission efficiency of a pepper Potato virus Y isolate. *Phytopathology* 89, 1176-1181.
- Llave, C., Martínez, B., Díaz-Ruiz, J.R., and López-Abella, D. (1999). Serological analysis and coat protein sequence determination of potato virus Y(PVY) pepper pathotypes and differentiation from other PVY strains. *European Journal of Plant Pathology* 105, 847-857.
- Tenllado, F., and Díaz-Ruiz, J.R. (1999). Complete resistance to pepper mild mottle tobamovirus mediated by viral replicase sequences partially depends on transgene homozygosity and is based on a gene silencing mechanism. *Transgenic Research* 8, 83-93.
- Lewis, J.C., López-Moya, J.J., and Daunert, S. (2000). Bioluminescence and secondary structure properties of aequorin mutants produced for site-specific conjugation and immobilization. *Bioconjugate Chemistry* 11, 65-70.
- López-Moya, J.J., and García, J.A. (2000). Construction of a stable and highly infectious cDNA clone of plum pox potyvirus, and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Research* 68, 99-107.
- Simón-Buela, L., Osaba, L., García, J.A., and López-Moya, J.J. (2000). Preservation of 5'-end integrity of a potyvirus genomic RNA is not dependent on template specificity. *Virology* 269, 377-382.
- Tenllado, F., and Bol, J.F. (2000). Genetic dissection of the multiple functions of alfalfa mosaic virus coat protein in viral RNA replication, encapsidation and movement. *Virology* 268, 29-40.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- García, J.A., Fernández-Fernández, M.R., and López-Moya, J.J. (1999). Proteinases involved in plant virus genome expression. En: *Proteases of infectious agents*. B.M. Dunn (Ed.). Academic Press.
- López-Moya, J.J., and García, J.A. (1999). Potyviruses (Potyviridae). En: *Encyclopedia of Virology, Second Edition*. R.G. Webster and A. Granoff (Eds.). Academic Press. Volume 3.

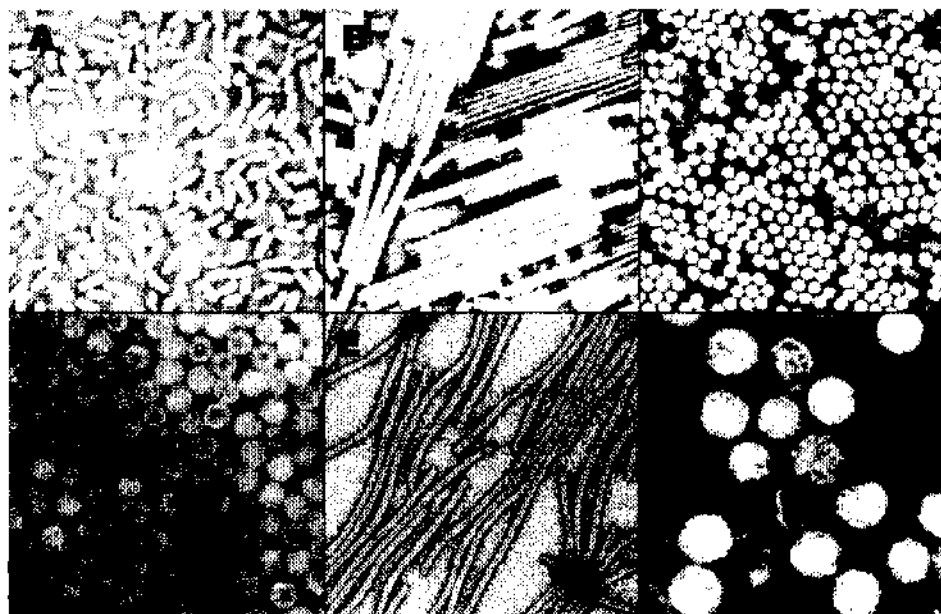


Figura: Micrografías electrónicas de tinciones negativas de partículas de distintos tipos representativos de virus de plantas purificados en nuestro laboratorio.

- A Partículas baciliformes de aproximadamente 18 nanómetros (nm) de diámetro y desde 30 hasta 60 nm de largo con simetría icosaédrica, correspondientes al virus del mosaico de la alfalfa (AMV), un *Alfamovirus* multiparticulado de genoma dividido constituido por tres moléculas lineales de RNA monocatenario (ssRNA) de sentido positivo.
- B Partículas alargadas rígidas de aproximadamente 18 nm de diámetro y 300-310 nm de largo con simetría helicoidal, correspondientes al virus del moteado suave del pimiento (PMMoV), un *Tobamovirus* de genoma constituido por una molécula lineal de ssRNA de sentido positivo.
- C Partículas isométricas de aproximadamente 28-30 nm de diámetro con simetría icosaédrica, correspondientes al virus del mosaico de la calabaza (SqMV), un *Comovirus* multiparticulado de genoma dividido constituido por dos moléculas lineales de ssRNA de sentido positivo.
- D Partículas isométricas de aproximadamente 50 nm de diámetro con simetría icosaédrica, correspondientes al virus del mosaico de la coliflor (CaMV), un *Caulimovirus* de genoma constituido por una molécula circular de DNA bicatenario (dsDNA).
- E Partículas alargadas flexuosas de aproximadamente 11-13 nm de diámetro y 680-800 nm de largo con simetría helicoidal, correspondientes al virus del grabado del tabaco (TEV), un *Potyvirus* de genoma constituido por una molécula lineal de ssRNA de sentido positivo.
- F Partículas pleomórficas de aproximadamente 80-120 nm de diámetro con simetría helicoidal y recubiertas de una membrana glicoprotéica, correspondientes al virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV), un *Tospovirus* de genoma dividido constituido por una molécula lineal de ssRNA de sentido negativo y dos moléculas lineales de ssRNA de doble sentido.

Figure: Electron micrograph of negatively stained particles of distinct, representative types of plant viruses purified in our laboratory.

- A Bacilliform particles of approximately 18 nanometers (nm) in diameter and from 30 to 60 nm long with icosahedral symmetry, corresponding to alfalfa mosaic virus (AMV), a multiparticulate *Alfamovirus* with a divided genome consisting of three linear, positive sense, single stranded RNA (ssRNA) molecules.
- B Rigid, elongated particles of approximately 18 nm in diameter and 300-310 nm long with helical symmetry, corresponding to pepper mild mottle virus (PMMoV), a *Tobamovirus* with a genome consisting of a linear, positive sense, ssRNA molecule.
- C Isometric particles of approximately 28-30 nm in diameter with icosahedral symmetry, corresponding to squash mosaic virus (SqMV), a multiparticulate *Comovirus* with a divided genome consisting of two linear, positive sense, ssRNA molecules.
- D Isometric particles of approximately 50 nm in diameter with icosahedral symmetry, corresponding to cauliflower mosaic virus (CaMV), a *Caulimovirus* with a genome consisting of a circular, double stranded DNA (dsDNA) molecule.
- E Flexuous, elongated particles of approximately 11-13 nm in diameter and 680-800 nm long with helical symmetry, corresponding to tobacco etch virus (TEV), a *Potyvirus* with a genome consisting of a linear, positive sense, ssRNA molecule.
- F Pleomorphic particles of approximately 80-120 nm in diameter with helical symmetry and embedded in a glycoprotein envelope, corresponding to tomato spotted wilt virus (TSWV), a *Tospovirus* with a divided genome consisting of one linear, negative sense, ssRNA molecule and two linear, ambisense, ssRNA molecules.

Interacciones Planta-Insecto *Insect-Plant Interactions*

PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ

Jefe de Grupo / *Group Leader*

FÉLIX ORTEGO ALONSO

Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

PEDRO HERNÁNDEZ CRESPO (Desde X-1999)

Investigador Contratado / *Research Associate*

MANUEL GONZÁLEZ NUÑEZ (Hasta IX-1999)

GEMA PÉREZ FARINÓS

ISMAEL SÁNCHEZ RAMOS

B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

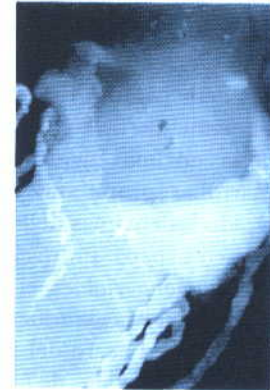
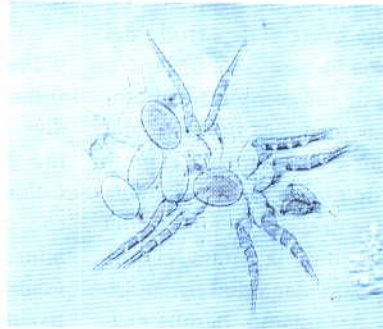
CRISTINA CABALLERO GARCÍA (Desde IV-1999)

MARTA DE LA POZA GÓMEZ (Desde II-2000)

B. Predoctorales / *Graduate Students*

M^a LUISA RUIZ SERRA

Personal Técnico / *Technician*



Palabras clave: Taladros del maíz, escarabajo de la patata, maíz-Bt, terpenoides, inhibidores de proteasas

El objetivo general del grupo es el desarrollo de métodos de control respetuosos con el medio ambiente y que prevengan o minimicen las pérdidas causadas por plagas agrícolas y de productos almacenados.

Evaluación de compuestos de origen botánico en el control de plagas

Se han estudiado los efectos de compuestos de origen botánico (metabolitos secundarios y proteínas de defensa) sobre la supervivencia, el comportamiento y la fisiología de insectos, y de ácaros de productos almacenados. Se han puesto a punto bioensayos con dieta artificial, discos foliares y plantas transgénicas para establecer su actividad. Hemos evaluado el potencial de control de varios terpenoides, pertenecientes a plantas de los géneros *Trichilia* y *Teucrium*, sobre el escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata*, y la guarda-

Keywords: Corn borers, Colorado potato beetle, Bt-maize, terpenoids, protease inhibitors

Our work is focused on the development of environmentally friendly control strategies that will prevent or minimize the losses caused by agricultural and stored product pests.

Potential of botanical compounds for pest control.

We have studied the effects of botanical compounds (secondary metabolites and defence proteins) on the survival, behaviour and physiology of key insect and mite pests. Accordingly, we have developed bioassay systems on artificial diets, on leaf disks and on transgenic plants to test these compounds. Several terpenoids from plants of the genus *Trichilia* and *Teucrium* has been assessed for its potential on the control of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Likewise, we have tested the activity of several monoterpenoids from plants of the genus *Lavandula*, *Mentha*

ma, *Spodoptera exigua*. De forma análoga, hemos determinado la actividad de monoterpenos, procedentes de los géneros *Lavandula*, *Mentha* y *Eucalyptus*, y de inhibidores de proteasas digestivas sobre el ácaro, *Tyrophagus putrescentiae*, plaga clave en el jamón curado, por estar prohibido el uso de acaricidas en este producto. Asimismo hemos estudiado el efecto de la supresión o sobre-expresión de inhibidores de proteasas en plantas transgénicas de tabaco y patata sobre el desarrollo del escarabajo de la patata y de la gardama.

El conocimiento de la interacción de los compuestos botánicos con las enzimas digestivas de las plagas es fundamental para desarrollar propuestas racionales de control. Hemos caracterizado las enzimas digestivas de plagas de importancia económica en España. Entre ellas, cabe destacar el taladro del maíz, *Sesamia nonagrioides*, el escarabajo de la patata, el curculiónido *Aubeonymus mariaefrancisciae*, (plaga de la remolacha azucarera) y el ácaro del jamón. Así mismo, hemos examinado las implicaciones de la ingestión de compuestos botánicos (ensayos de alimentación de corta y larga duración) sobre la actividad de proteasas digestivas y enzimas de detoxificación de algunas de estas especies.

Implicaciones ambientales del cultivo del maíz Bt (*Bacillus thuringiensis*)

Desde 1998, en que se inicia la comercialización del maíz Bt en España, se ha establecido un programa de seguimiento para detectar la posible aparición de resistencia en poblaciones de taladros del maíz y para evaluar el impacto potencial sobre la fauna auxiliar asociada a este cultivo. Hemos determinado la línea base de susceptibilidad a la toxina Cry1Ab por ser la expresada en el maíz Bt cultivado en España, en poblaciones de taladros de maíz (*S. nonagrioides* y *Ostrinia nubilalis*) recogidas sobre maíz no transgénico en las principales zonas maiceras. A partir del segundo año, hemos recogido poblaciones de ambas especies de taladros en campos de maíz Bt localizados en las mismas áreas geográficas. No se han encontrado cambios en la susceptibilidad tras tres años de exposición al maíz Bt. Por último, hemos iniciado en el año 2000 la evaluación, en campos comerciales, del posible impacto del maíz Bt sobre la diversidad y la abundancia de la fauna auxiliar, particularmente depredadores y parasitoides.

and *Eucalyptus*, and several plant protease inhibitors, on the mold mite, *Tyrophagus putrescentiae*, a key pest of dry-cured ham, a product where it is banned the use of acaricides. In addition, we have examined the effect of the suppression or over-expression of protease inhibitors in tobacco and potato transgenic plants on the growth and development of the Colorado potato beetle and the beet armyworm.

The knowledge of the interaction of botanical compounds with the digestive enzymes of target pests is essential to develop rational control strategies. Thus, we have characterized the digestive proteases of several important pests in Spain, such as the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, the Colorado potato beetle, the weevil *Aubeonymus mariaefrancisciae*, a new sugar beet pest, and the mold mite. We have also examined the implications of the ingestion of botanical compounds (short- and long-term feeding assays) on the activity of the digestive proteases and detoxication enzymes of some of these species.

Environmental implications of Bt (*Bacillus thuringiensis*) maize crops

The commercial release of transgenic Bt maize in Spain in 1998 prompted a monitoring research project to establish an early detection of corn borers resistance and to assess the potential impacts on beneficial arthropods associated with Bt maize. Baseline susceptibility to the Cry1Ab toxin (protein expressed in the Bt-maize grown in Spain) was determined for Spanish populations of the corn borers (*Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis*), collected on non-transgenic maize. Annual monitoring of field populations of both species collected from Bt maize on the same geographical areas has not revealed changes in susceptibility after three years of Bt-maize cultivation in Spain. Experiments in commercial fields have been initiated in 2000 to assess the potential impact of Bt maize on the diversity and abundance of beneficial arthropods, particularly predators and parasitoids.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- INIA, SC98-046-C3-3 (1998-2001)
- CICYT, AGF98-0805-CO2-01 (1998-2000)
- Comisión Conjunta Hispano-Norteamericano, 99102 (1999-2000)
- CSIC/CITMA (99CU0021) (1999-2000)
- M^o Medio Ambiente (1999-2002)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Concepcion Novillo Almendros.** Proteasas digestivas del taladro del maíz, *Sesamia nonagrioides* Lef. y del escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata* (Say): Caracterización y efecto de inhibidores de proteasas. Universidad Politécnica de Madrid, 1999. Directores: Félix Ortego Alonso y Pedro Castañera Domínguez
- **Gema Pérez Farinós.** Biología y control de *Aubeonimus mariaefranciscæ* Roudier (Coleoptera, Curculionidae), plaga de la remolacha azucarera. Universidad Complutense 2000. Director: Pedro Castañera Domínguez
- **Ismael Ignacio Sánchez Ramos.** Biología y control de *Tyrophagus putrescentiae* (Schränk, 1781) (Astigmata: Acaridae), plaga de productos almacenados. Universidad Complutense 2000. Director: Pedro Castañera Domínguez

Publicaciones/Publications**Artículos en Revistas/Journal Articles**

- Hernández-Crespo, P., Hails, R.S., Sait, S., Green, B.G., Carty, T.M., and Cory, S.J. (1999). Response of hosts of varying susceptibility to recombinant Baculovirus insecticide in the field. *Biol. Control* 16, 119-127.
- López-Olguín, J., De La Torre, M. C., Ortego, F., Castañera, P., and Rodríguez, B. (1999). Structure-activity relationship of natural and synthetic neo-clerodane diterpenes from *Teucrium* against Colorado potato beetle larvae. *Phytochemistry* 50, 749-753.
- Novillo, C., Castañera, P., and Ortego, F. (1999). Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29, 177-184.
- Ortego, F., López Olguín, J., Ruiz, M., and Castañera, P. (1999). Effects of toxic and deterrent terpenoids on digestive protease and detoxication enzyme activities of Colorado potato beetle larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.* 63, 76-84.
- Pérez-Farinós, G., Smaghee, G., Tirry, L., and Castañera, P. (1999). Action and pharmacokinetics of a novel insect growth regulator, halofenozide, in adult beetles of *Aubeonimus mariaefranciscæ* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41, 201-203.
- Pérez-Farinós, G., Taberner A., Marco V., and Castañera, P. (1999). Laboratory rearing of a new sugar beet pest, *Aubeonimus mariaefranciscæ* (Coleoptera, Curculionidae), on artificial diet and its oviposition behavior. *J. Econ. Entomol.* 92, 351-356.
- Royo, J., Leon, J., Vancanneyt, G., Albar, J.P., Rosahl, S., Ortego, F., Castañera, P., and Sánchez-Serrano, J. (1999). Antisense mediated depletion of a potato lipoxigenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96, 1146-1151.
- Castañera, P., and Ortego, F. (2000). El maíz transgénico en España. *Mundo Científico* 210, 43-47.
- González-Núñez, M., Ortego, F., and Castañera, P. (2000). Susceptibility of Spanish populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J. Econ. Entomol.* 93, 459-463.
- Hernández-Crespo P., López C., Bergoin, M., and Quiot, J.M. (2000). Establishment of two new orthopteran cell lines *in vitro*. *Cel. Devel. Biol.* 36, 559-562.
- Hernández-Crespo, P., Veyrunes, J.C., Cousserans, F., and Bergoin, M. (2000). The spheroidin of an Entomopoxvirus isolated from the grasshopper *Anacridium aegyptium* (AaEPV) shares low homology with spheroidins from lepidopteran or coleopteran EPVs. *Virus Res.* 67, 203-213.
- Lara, P., Ortego, F., González-Hidalgo, E., Castañera, P., Carbonero, P., and Díaz, I. (2000). Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. *Transg. Res.* 9, 169-178.
- Ortego, F., Sánchez-Ramos, I., Ruiz, M., and Castañera, P. (2000). Characterization of proteases from the stored product mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 43, 116-124.
- Pernas, M., Sánchez-Ramos, I., Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., Arteaga, C., Castañera, P., and Salcedo, S. (2000). Der p I and Der p II, the highly related and major allergens from house dust mites, are differentially affected by a plant cystatin. *Clin. Exp. Alergy* 30, 972-978.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- López-Olguín, J.F., Aragón, A., Handal, A., Viñuela, E., and Castañera, P. (1999). Métodos para la extracción y evaluación de actividad de productos vegetales contra insectos. En: Recursos Naturales Medio Ambiente y Agricultura: Problemas y Estrategias Aragón, A., López-Olguín, J.F. (eds). Benemérita Universidad de Puebla, Puebla, Mexico, pp 99-113.
 - Castañera, P., and García-Arenal, F. (2000). Plantas transgénicas y medio ambiente. En: la Biotecnología aplicada a la agricultura Casal, I., García López, J.L., Guisan, J.M., & Martínez-Zapater, J.M (eds). SEBIOT, Eumedia, S.A., pp 224-238.
 - Castañera, P., and Ortego, F. (2000). ¿Cuales son los efectos de las plantas transgénicas resistentes a plagas de insectos en el medio ambiente? ¿Matan a los insectos beneficiosos? En: Biotecnología en Pocas Palabras I. Plantas Transgénicas (Preguntas y Respuestas). Sociedad Española de Biotecnología. 47 pp. Artes Gráficas G3 S.A., Spain.
-

Departamento de Estructura y Función de Proteínas
Department of Protein, Structure and Function

Jefe de Departamento
Department Head

EDUARDO RIAL
GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO (Hasta III-1999)

Profesores de Investigación

J. MANUEL ANDREU MORALES
PEDRO J. APARICIO ALONSO
MANUEL ESPINOSA PADRÓN
GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO
VICENTE LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA
JUAN M. RAMÍREZ DE VERGER LOBO

Investigadores Científicos

SANTIAGO LAMAS PELÁEZ (Desde VIII-2000)
PALOMA LÓPEZ GARCÍA
ANTONIO ROMERO GARRIDO (Desde VIII-2000)

Científicos Titulares

M^a ROSA LOZANO PUERTO
M^a DOLOREZ PÉREZ-SALA GOZALO
EDUARDO RIAL ZUECO
GERMÁN RIVAS CABALLERO
LUIS I. RIVAS LÓPEZ

Personal Técnico

MARÍA TERESA ALDA LÓPEZ
M^a ANGELES CORRALES GONZÁLEZ
CONCEPCIÓN FERNÁNDEZ-CABRERA BAZÁN
MERCEDES JIMÉNEZ SARMIENTO (Desde I-2000)
ROSA MARTÍNEZ-DALMAU
LUCAS OYA TARDÍO
PILAR ZARAGOZA JIMÉNEZ
MERCEDES ZAZO GUÑO

Secretaria

M^a DEL CARMEN PARTEARROYO LACABA

Bioquímica y Biología Molecular del Óxido Nítrico *Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide*

SANTIAGO LAMAS

Jefe de Grupo / *Group Leader*

M^a DOLORES PÉREZ-SALA GOZALO

Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

CARLOS ZARAGOZA SÁNCHEZ (Desde V-1999)

PETER KLATT (Hasta III-2000)

Investigadores Contratados / *Research Associates*

ANTONIO MARTÍNEZ RUIZ (Desde IV-2000)

FERNANDO RODRÍGUEZ PASCUAL (Desde IV-2000)

B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

EVA MARÍA CERNUDA MOROLLÓN

MARIELA DÍAZ CAZORLA (Hasta VI-1999)

OCTAVIO HERNÁNDEZ PERERA (Hasta VI-1999)

F. JAVIER NAVARRO ANTOLÍN

ESTELA PINEDA MOLINA

B. Predoctorales / *Graduate Students*

MARÍA JESÚS CARRASCO SOTO

ESTRELLA SORIA LÓPEZ

Personal Técnico / *Technicians*



Palabras clave: Óxido nítrico, endotelio, expresión génica, disfunción endotelial, estrés oxidativo

Regulación de la expresión génica y actividad de proteínas por estrés oxidativo y nitrosativo

El óxido nítrico (NO) es un mediador biológico con acciones fisiológicas bien reconocidas en los sistemas cardiovascular, nervioso e inmune. En los últimos años también se ha puesto de manifiesto que actúa como un señalizador intracelular gracias a su naturaleza de radical libre y gas altamente difusible. Esta propiedad le permite interactuar con radicales libres derivados del oxígeno, grupos hemo y grupos tioles de las proteínas entre otros. En el laboratorio perseguimos el estudio de estas interacciones del NO con factores de transcripción implicados en respuestas fisiopatológicas. Hemos observado que, tras la exposición a donadores de NO, una de las subunidades constituyentes del factor de transcripción AP-1, c-Jun, experimenta una incorporación de glutatión for-

Keywords: Nitric oxide, endothelium, gene expression, endothelial dysfunction, oxidative stress

Regulation of gene expression and protein function by oxidative and nitrosative stresses

Nitric oxide (NO) is a biological mediator with well established biological actions in the cardiovascular, nervous and immune systems. In recent years it has been shown that it may also act as an intracellular signalling molecule due to its properties as a free-radical gas with high diffusibility. This allows NO to interact with reactive oxygen species, heme and thiol groups of proteins among others. In our laboratory we are interested in studying the interactions of NO with transcription factors involved in pathophysiological responses. We have observed that, after exposure to NO donors, one of the subunits of the transcription factor AP-1, c-Jun, is modified by the incorporation of glutathione to a specific cysteine residue. This glutathionylation correlates tightly with the inhibition of binding to DNA of c-Jun. This modification

mando un disulfuro mixto con una cisteína específica y que esta glutationilación se correlaciona estrechamente con una inhibición de la unión al ADN de c-Jun. Esta modificación es reversible y también tiene lugar tras estrés oxidativo y puede ocurrir en otros factores de transcripción tal y como hemos demostrado para la subunidad p50 de NF-kappaB. Pretendemos conocer la importancia biológica de esta modificación y de otras modificaciones inducidas por el NO como la S-nitrosilación ya que pueden representar mecanismos de acoplamiento de las señales extracelulares que promueven estrés oxidativo o nitrosativo a respuestas específicas de expresión génica.

Análisis molecular de la disfunción endotelial

La disfunción endotelial es un fenómeno fisiopatológico que implica una respuesta homeostática inadecuada por parte del endotelio. Su importancia ha sido demostrada en patologías tan prevalentes como la arteriosclerosis o la hipertensión. Una de sus manifestaciones es la incapacidad del endotelio para mantener un tono vasodilatador tanto basal como en respuesta a agonistas específicos. En su patogenia interviene una alteración del balance de los factores endoteliales vasoactivos como el NO y la endotelina-1 (ET-1), un potente vasoconstrictor. Nuestro laboratorio ha estudiado la respuesta de células endoteliales en cultivo a modelos farmacológicos de daño (Ciclosporina A) o protección (los inhibidores de la HMG-CoA reductasa conocidos como estatinas) endoteliales. En el caso del inmunosupresor Ciclosporina A hemos observado que este fármaco modula la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el endotelio y que también puede aumentar a largo plazo la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por un mecanismo transcripcional. Las estatinas son fármacos hipolipemiantes que se han revelado como protectoras de la disfunción endotelial en estudios clínicos. Nuestros datos sugieren que esta protección tiene lugar por un aumento relativo de la producción de NO frente a endotelina-1 ya que la expresión de la eNOS no se inhibe por LDL oxidada en presencia de estatinas y la síntesis de ET-1 se inhibe por estas últimas. Proponemos además que las proteínas G de bajo peso molecular de la familia Rho participan en la regulación del balance de factores vasoactivos en la célula endotelial.

is reversible, also occurs after oxidative stress and may take place in other transcription factors as we have shown for the p50 subunit of NF-kappaB. We intend to understand the biological importance of this and other NO-related modifications of proteins such as S-nitrosylation, as they may represent mechanisms for the coupling of extracellular signals which promote oxidative or nitrosative stresses to specific responses of gene expression.

Molecular analysis of endothelial dysfunction

Endothelial dysfunction is a pathophysiological phenomenon which involves a perturbed homeostatic response of the endothelium. Its importance has been proven in pathological conditions with such prevalence as atherosclerosis or hypertension. One of its features is the altered capacity of the endothelium to maintain a vasodilator tone, both basally and in response to endothelial agonists. Its pathogenesis may be related to a disturbance in the balance of endothelial vasoactive factors such as NO or the powerful vasoconstrictor endothelin-1 (ET-1). Our laboratory has studied the response of endothelial cells in culture under two pharmacological models of endothelial injury (Cyclosporin A) or protection (the HMG-CoA reductase inhibitors known as statins). In the case of the immunosuppressor Cyclosporin A we observed that this drug modulates the production of reactive oxygen and nitrogen species in endothelial cells and that it may also increase endothelial nitric oxide synthase expression (eNOS) in the long term by a transcriptional mechanism. Statins are lipid lowering agents which protect against endothelial dysfunction in clinical studies. Our data suggest that this protection may take place by a relative increase in the production of NO versus ET-1, as eNOS expression is protected from oxidized LDL-induced downregulation in the presence of statins and the latter inhibit ET-1 synthesis. Furthermore we propose that the small GTP binding proteins of the Rho family participate in the regulation of the balance of endothelial vasoactive mediators.

Regulation of nitric oxide synthesis

NO is synthesized by enzymes known as NO synthases (NOS). The activity of endothelial NOS is mainly regulated by posttranslational mechanisms. The regulation of inducible NOS involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms that control the levels of mRNA and protein. Our group is inte-

Regulación de la síntesis de óxido nítrico

El NO es sintetizado por enzimas denominadas NO sintetas (NOS). La actividad de la NOS endotelial se regula fundamentalmente por mecanismos postraduccionales. La regulación de la NOS inducible tiene lugar sobre todo a nivel de su expresión por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de los mecanismos de regulación de la síntesis de NO en células de la pared vascular. Hemos observado que la NOS inducible está sujeta a una estrecha regulación por NO y GMPc y que existe una regulación recíproca entre las vías de síntesis de NO y de prostaglandinas. Esta interacción puede ser de especial relevancia en condiciones fisiopatológicas, como la inflamación y la arteriosclerosis. Un aspecto importante de estos estudios es el hecho de que varios fármacos que se usan ampliamente en la terapia de enfermedades cardiovasculares, como las estatinas, ciertos hipolipemiantes y anti-diabéticos orales, ejercen un efecto protector sobre la función vascular por mecanismos potencialmente relacionados con la modulación de la expresión de las NOS endotelial e inducible. Nos interesa explorar los procesos concretos que dan lugar a estos efectos. Nuestros resultados indican que metabolitos de la vía de síntesis de isoprenoides, que es inhibida por las estatinas, son importantes para la regulación de ambas formas de NOS, y que en el caso de ciertos hipolipemiantes y de prostaglandinas, que modulan la expresión de la NOS inducible, sus efectos pueden ser estar relacionados con su capacidad para actuar como agonistas de factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares.

rested in studying the mechanisms of regulation of NO synthesis in cells of the vascular wall. We have observed that inducible NOS is subjected to a feedback regulation by the NO-cGMP pathway. There is also a significant cross-talk between the NO and prostaglandins biosynthetic pathways, which may be particularly relevant under physiopathological conditions, such as inflammation and atherosclerosis. An important aspect of these studies is related to the fact that several drugs widely used in the treatment of cardiovascular disease, including statins, hypolipidemic agents and oral antidiabetics modulate the bioavailability of NO. The mechanisms proposed include the regulation of the expression of the endothelial and inducible isoforms of NOS. We are interested in elucidating the cellular events that are responsible for these effects. Our results point towards the involvement of metabolites of the isoprenoid biosynthetic pathway, which is inhibited by statins, in the regulation of both forms of NOS. They also raise the importance of the ability of some prostaglandins and hypolipidemic agents to function as agonists of nuclear receptors for the modulation of inflammation and iNOS expression.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- CICYT, SAF97-0035 (1997-2000)
- Merck, Sharp & Dohme (1999-2000)
- CAM, (1999-2000)
- UE, (BIOMED-2) BMH4-CT96-0979 (1998-2000)
- Comité Conjunto Hispano-Norteamericano (1999-2000)
- Fundación Ramón Areces (2000-2002)
- Programa FEDER, (MEC) 2FD97-1432 (1999-2001)
- CICYT, SAF 2000-149 (2000-2003)
- Fundación Renal "Iñigo Alvarez de Toledo" (1999-2000)
- Sociedad Española de Nefrología (1999)

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- **Mariela Díaz Cazorla.** Regulación de la expresión de la ciclooxigenasa tipo 2 en células mensangiales humanas. Modulación por óxido nítrico. Universidad de Alcalá de Henares. 1999. Directores: Dr. Santiago Lamas y Dra. Dolores Pérez-Sala.
- **Francisco Javier Navarro-Antolin.** Inducción transcripcional del gen de la sintasa endotelial del óxido nítrico y formación de peroxinitrito en el endotelio vascular en respuesta a ciclosporina A. Universidad Autónoma de Madrid, 2000. Director: Dr. Santiago Lamas

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

- Díaz-Cazorla, M., Pérez-Sala, D., and Lamas, S. (1999). Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 943-952.
- Díaz-Cazorla, M., Pérez-Sala, D., Ros, J., Jiménez, W., Fresno, M., and Lamas, S. (1999). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells: transcriptional inhibition by IL-13. *Eur. J. Biochem.* 260, 268-274.
- Klatt, P., Pineda-Molina, E., and Lamas, S. (1999). Nitric Oxide inhibits c-Jun DNA binding by specifically targeted S-glutathionylation. *J. Biol. Chem.* 274, 15857-15864.
- Klatt, P., Pineda-Molina, E., García de Lacoba, C., Padilla A., Martínez-Galisteo, E., Bárcena, J.A., and Lamas, S. (1999). Redox Regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathionylation. *FASEB J.* 13, 1481-1490.
- González-Santiago, L., López-Ongil, S., Lamas, S., Quereda, C., Rodríguez-Puyol, M., and Rodríguez-Puyol, D. (2000). Imbalance in endothelial vasoactive factors as a possible cause of cyclosporin toxicity: A role for endothelin-converting enzyme. *J. Lab. Clin. Med.* 136, 396-401.
- Hernández-Perera, O., Pérez-Sala, D., Soria, E., and Lamas, S. (2000). Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ. Res.*, 87, 616-622.
- Klatt, P., and Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathionylation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* 267, 1-18.
- Klatt, P., Pineda-Molina, E., Pérez-Sala, D., and Lamas, S. (2000). Novel application of S-nitrosoglutathione sepharose to identify proteins which are potential targets for S-nitrosoglutathione-induced mixed-disulphide formation. *Biochem. J.* 349, 567-578.
- López-Ongil, S., Torrecillas, G., Pérez-Sala, D., González-Santiago, L., Rodríguez-Puyol, M., and Rodríguez-Puyol, D. (1999). Mechanisms involved in the contraction of endothelial cells by hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 501-510.
- Navarro-Antolin, J., and Lamas, S. (2000). La Ciclosporina A produce anión superóxido en el endotelio. *Nefrología* 20, S31-35.
- Navarro-Antolin, J., Rey-Campos, J., and Lamas, S. (2000). Transcriptional induction of endothelial nitric oxide gene (eNOS) by Cyclosporine A: a role for AP-1. *J. Biol. Chem.* 275, 3075-3080.
- Pérez-Sala, D., and Rebollo, A. (1999). Novel aspects of Ras proteins biology: regulation and implications. *Cell Death Differ.* 6, 722-728.
- Rebollo, A., Pérez-Sala, D., and Martínez-A.C. (1999). Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: Implications in prevention of apoptosis. *Oncogene* 18, 4830-4839.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

- Navarro-Antolin, J., and Lamas, S. (1999). Transferencia génica vascular en la hipertensión arterial En Cuadernos Latino-Americanos de Hipertensión. Doyma

Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores *Mitochondrial Bioenergetics: Uncoupling Mechanisms*

EDUARDO RIAL ZUECO

Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

SONIA BAÑUELOS RODRÍGUEZ (Hasta XI-1999)

AMALIA LEDESMA FERNÁNDEZ (Desde II-2000)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

JESÚS JIMÉNEZ JIMÉNEZ (Desde VI-1999)

PAULA TOMÁS GARCÍA (Desde IX-2000)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

PILAR ZARAGOZA JIMÉNEZ

Personal Técnico / *Technician*



Palabras clave: Mitochondria, bioenergética, proteína desacoplante, obesidad, levadura

La fosforilación oxidativa mitocondrial engloba las reacciones que llevan a la síntesis de ATP utilizando la energía disponible tras la oxidación de sustratos en la cadena respiratoria. El acoplamiento de los dos procesos se realiza a través del gradiente de potencial electroquímico de protones que es generado por la cadena respiratoria durante la transferencia de electrones desde los sustratos hasta el oxígeno. Nuestro grupo investiga sistemas en los que este esquema básico se encuentra modificado de modo que parte de la energía se disipa en forma de calor.

La producción de calor en el tejido adiposo pardo: la proteína desacoplante UCPI

En las mitocondrias del tejido adiposo pardo la proteína desacoplante UCPI permite la re-entrada de los protones a la matriz disipando, por tanto, el gradiente de potencial electroquímico. Este mecanismo disipador de energía es la clave de la actividad termogénica del tejido. La UCPI se encuentra

Keywords: Mitochondria, bioenergetics, uncoupling protein, obesity, yeast

The mitochondrial oxidative phosphorylation embraces several reactions that allow ATP synthesis using the energy made available from substrate oxidation at the respiratory chain. The two processes are coupled through the proton electrochemical potential gradient generated during the transfer of electrons from the substrates to oxygen. Our group investigates systems where this scheme has been modified so that part of the energy can be dissipated as heat.

Thermogenesis in brown adipose tissue: the uncoupling protein UCPI

Brown fat mitochondria possess an uncoupling protein (UCPI) which catalyzes proton reentry into the matrix thus dissipating its electrochemical potential gradient. This energy dissipating mechanism is the key of the thermogenic activity of the tissue. UCPI is regulated at two levels: gene expression and proton transport activity. α -agonists induce the expression of the gene although thyroid hormones and retinoic acid are also acti-

regulada a dos niveles: por una parte en la expresión del gen y por otra en la actividad transportadora de protones. La expresión del gen es inducida tras la estimulación de receptores β -adrenérgicos, aunque las hormonas tiroideas y el ácido retinoico son también activadores de la transcripción. A nivel mitocondrial, su actividad se encuentra inhibida mediante nucleótidos de purina y los ácidos grasos son los activadores. Esta regulación tiene un gran sentido fisiológico ya que tras la estimulación noradrenérgica del adipocito pardo se va a estimular la lipólisis, se liberan ácidos grasos y éstos se van a oxidar en la mitocondria. Son estos mismos ácidos grasos los que van a activar la UCP1 actuando, por tanto, como segundos mensajeros de la noradrenalina. Recientemente hemos demostrado que el ácido *todo-trans* retinoico es también un potente activador de la UCP1 a nivel mitocondrial.

La UCP1 es miembro de la familia de transportadores de la membrana interna mitocondrial. El hallazgo de que bajo determinadas condiciones estos transportadores pierden su especificidad y actúan como canales o como poros ha llevado a la propuesta de la existencia, en el interior de la proteína, de un canal intrínseco inespecífico que se encontraría encubierto tras dominios particulares que confieren a cada transportador sus propiedades específicas. Nuestro grupo está interesado en el análisis estructural y funcional de la proteína y en este momento tiene dos objetivos principales. En primer lugar, establecer los dominios de la UCP1 implicados en el control del transporte, centrándonos en el papel de los tres dominios de la UCP1 que se encuentran orientados hacia la matriz mitocondrial. En segundo lugar, localizar las regiones implicadas en la unión de los activadores y en particular el ácido retinoico.

La proteína desacoplante UCP2: una nueva aproximación para el tratamiento de la obesidad

En 1997 se describió la existencia de dos proteínas homólogas a la UCP1 y que se denominaron UCP2 y UCP3. Las dos proteínas se encuentran en humanos pero su distribución anatómica es diferente. La UCP2 se encuentra en muchos tejidos y órganos (adiposo pardo y blanco, músculo esquelético, riñón, pulmón, etc.) mientras que la UCP3 se encuentra exclusivamente en la musculatura esquelética y tejido adiposo pardo. Este descubrimiento levantó una gran expectación

de los investigadores. *At the mitochondrial level, the activity is inhibited by purine nucleotides and activated by fatty acids. This regulation has a physiological meaning. Noradrenergic stimulation of the adipocyte leads to an increased lipolysis that results in the release of fatty acids. These fatty acids play a dual role. They are substrate for oxidation and the cytosolic second messengers of noradrenaline that activate UCP1. We have recently shown that retinoic acid is also a powerful activator of UCP1 at the mitochondrial level.*

UCP1 is a member of a protein superfamily that comprises the metabolite carriers of the mitochondrial inner membrane. The discovery that, under certain conditions, these carriers can lose their specificity and behave like channels or like pores has led to the proposal of the existence, within the protein, of an intrinsic channel that would be hidden by the domains that confer the specific transport properties to each carrier. Our group investigates the structure and function of this protein and we currently have two objectives. First, we are trying to determine the UCP1 domains that confer the specificity to the protein and that are implicated in its regulation. Our work is centred on the study of the three domains that face the matrix side of the membrane. Second, we are trying to determine the regions involved in the binding of the activating ligands and particularly retinoic acid.

The uncoupling protein UCP2: a new approach for the treatment of obesity

In 1997 two proteins homologous to UCP1 were discovered and named UCP2 and UCP3. The two proteins are present in humans but their tissue distribution is different. UCP2 is present in many tissues and organs (white and brown adipose tissue, skeletal muscle, kidney, lung, etc.) While UCP3 is only present in brown fat and skeletal muscle. This discovery raised many expectations because the two proteins are present in the adult human and their expression levels seem to respond to diet related stimuli. Therefore, the data indicate that these proteins could be good targets for the development of new anti-obesity drugs.

The investigation of the regulation of the activity of the UCP2 has become an area of interest of our research group since the very first reports showed that fatty acids and nucleotides were not affecting UCP2. The search for the regulator gave a positive

ya que ambas se encuentran en el hombre adulto y parecen responder a estímulos relacionados con la dieta. Su interés radica en que estas proteínas podrían ser la base molecular del mecanismo disipador de energía que permiten eliminar un exceso de calorías ingeridas en la dieta en humanos. Se habría abierto, por tanto, una nueva vía para el tratamiento de la obesidad, y de hecho, ambas proteínas son consideradas dianas terapéuticas.

El estudio de la regulación de la actividad de esta proteína desacoplante se convirtió desde el primer momento en una tarea de nuestro grupo ya que los primeros trabajos revelaron que ni los ácidos grasos ni los nucleótidos afectan su actividad. La búsqueda del posible regulador dio resultado ya que demostramos que el ácido *todo-trans* retinoico activaba la respiración en mitocondrias de levaduras que expresaban UCP2 de modo recombinante. En contra con lo que ocurre con la UCP1, la UCP2 muestra una alta especificidad por el activador ya que de momento sólo el ácido *todo-trans* retinoico y el retinoide TTNPB han demostrado ser activos. Nuestro grupo trabaja en la actualidad en el estudio de las bases estructurales que determinan esta especificidad. El fin último es la localización de un activador específico de la UCP2 que se pueda utilizar como fármaco anti-obesidad.

result when we discovered that all-trans retinoic acid was activating mitochondrial respiration in yeasts expressing UCP2. In contrast to UCP1, UCP2 displays a high specificity towards the activating ligand and thus only all-trans retinoic acid and TTNPB are activators. Our group is currently working on the structural basis of this specificity. The final aim is the discovery of a specific UCP2 activator that could be used as an anti-obesity drug.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- Human Frontiers Science Program, RG0307/1998-M (1998-2001)
- DGES, PB95-0118 (1996-1999)
- CICYT, Petri 95-0262-OP (1998-2000)
- CICYT, BIO99-0870 (2000-2002)
- Allergan Inc. (2000-2002)

Patentes/Patents

- Jiménez-jiménez, J., and Rial, E. (2000). Método para la determinación de la actividad de las proteínas desacoplantes (UCPs). P200001702

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- González-Barroso, M.M., Fleury, C., Jiménez, M.A., Sanz, J.M., Romero, A., Bouillaud, F., and Rial, E. (1999). Structural and functional study of a conserved region in the uncoupling protein UCPI: the three matrix loops are involved in the control of transport. *J. Mol. Biol.* 292, 137-149.
- Nicholls, D.G., and Rial, E. (1999). A history of the first uncoupling protein, UCPI. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 399-406.
- Rial, E. (1999). Las UCPs: una nueva vía para el tratamiento de la obesidad. *Fórmula* 5, 281-284.
- Rial, E., González-Barroso, M.M., Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jiménez-Jiménez, J., Ricquier, D., Goubern, M., and Bouillaud, F. (1999). Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCPI and UCP2. *EMBO J.* 18, 5827-5833.

Biología Estructural de Proteínas *Structural Biology of Proteins*

GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO

Jefe de Grupo / *Group Leader*

M^a ROSA LOZANO PUERTO

JUAN MANUEL RAMÍREZ DE VERGER

ANTONIO ROMERO GARRIDO

Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

DAVID A. WAH (Hasta VII-1999)

B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

MARÍA FERNÁNDEZ LÓPEZ LUCENDO

CARLOS FERNÁNDEZ TORNERO

MARÍA LUISA NAVARRO RICO (Hasta IV-1999)

ALVARO RAMÓN GONZÁLEZ

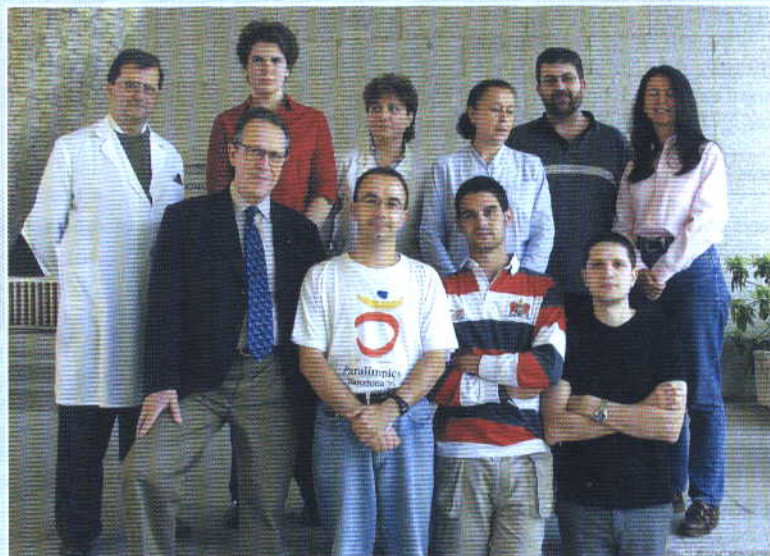
MARIANO REDONDO HORCAJO

B. Predoctorales / *Graduate Students*

CONCEPCIÓN FERNÁNDEZ CABRERA

MERCEDES ZAZO GUÍO

Personal Técnico / *Technicians*



Palabras clave: Factores de crecimiento para fibroblastos, antiangiogenesis, factor-4 de plaquetas, neumococo, enzimas líticas, biología estructural, RMN, cristalografía de proteínas, diseño de fármacos

Nuestro grupo pretende determinar las bases estructurales de las actividades biológicas de las proteínas. Dentro de este marco general, una parte considerable del trabajo del grupo gira alrededor de la biología estructural de los factores de crecimiento para fibroblastos, tema al que ha estado ligado desde el descubrimiento del primer miembro de esta familia de proteínas. Los resultados obtenidos a este respecto están recogidos en más de setenta artículos publicados en revistas de la más amplia difusión internacional. Los estudios estructurales sobre esta proteína son paralelos además a otros más fisiológicos que se llevan a cabo en colaboración con el Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal. La interacción entre estas dos líneas está llevando a resultados que pueden ser importantes para el desa-

Keywords: Fibroblast growth factor, antiangiogenesis, platelet factor-4, pneumococci, lytic enzymes, structural biology, NMR, protein crystallography, drug design

The research of our group is aimed at the study of the structural basis of the biological properties of the proteins. Special attention is paid to the structural biology of the fibroblast growth factors, a subject to which the group has been very closely associated since the discovery of the first member of this family of proteins. The results obtained by our group in this field have appeared in more than seventy articles that have been published in journals of wide international impact. The structural studies of our group on these proteins run parallel to other studies that are mainly focused on their physiology which are being carried out in collaboration with the Research Department of the University Hospital Ramón y Cajal. The interaction between these two main lines of research is yielding results of potential relevance for drug development in the fields of hypertension, wound healing, protection against the effect of ischemia-reperfu-

rollo de futuros fármacos en el terreno de la hipertensión, la cicatrización de heridas, la prevención de los daños causados por la isquemia transitoria y para el tratamiento del cáncer.

Por otro lado, estamos interesados en el estudio de los mecanismos desarrollados por *Streptococcus pneumoniae* en los procesos infectivos desplegados por este patógeno. Hemos resuelto recientemente, mediante difracción de rayos-X, la estructura tridimensional del dominio de unión a colina de una proteína localizada en la pared celular del neumococo LytA en complejo con colina, el ligando natural presente en los ácidos teicoico y lipoteicoicos de la pared celular. La estructura representa un nuevo plegamiento del tipo solenoidal a través de horquillas beta, que se pliegan formando una superhélice. El modelo molecular constituye un gran avance en el conocimiento de las bases moleculares desarrolladas por este patógeno en los procesos infectivos, y sirve de base para otros dominios de unión a colina presentes en bacterias Gram-positivas. Asimismo, estamos interesados en la estructura completa de estas enzimas: LytA y LytB, así como de una enzima quimérica del fago: Pal. Estas estructuras sentarían las bases para elucidar el mecanismo detallado por el que actúan. Los resultados podrían dar lugar al diseño específico de fármacos que constituyan terapias alternativas en las patologías en las que están involucradas.

El grupo dispone en estos momentos de las instalaciones necesarias para llevar a cabo la biología molecular y química de proteínas necesarias para llevar a cabo los estudios estructurales de alta resolución. Tiene acceso además en el Centro a un conjunto bastante actualizado de instrumentos para realizar estudios estructurales de baja resolución. Nuestro grupo tiene también acceso al espectrómetro de resonancia magnética nuclear del Instituto de Estructura de la Materia.

sion insults, and tumour treatment.

On the other hand we are interested in the study of the mechanisms developed by *Streptococcus pneumoniae* in the invasive diseases deployed by this pathogen. We have recently solved the crystal structure of the choline-binding domain of LytA complexed with choline, its natural ligand present in teichoic and lipoteichoic acids of the bacterial cell wall. The structure is a novel solenoid protein fold consisting exclusively of β -hairpins that stack to form a left-handed superhelix. The C-terminal hairpin, which is implicated in the formation of the putative biological dimer, diverges from this pattern. We will pursue the determination of the three-dimensional structures of several proteins located in the cellular wall of pneumococci: LytA and LytB, as well as a quimeric enzyme in the bacteriophage: Pal. These structures would permit the elucidation of the detailed mechanisms by which these proteins work. These results could lead to the development of specific drugs constituting alternative therapies for these pathologies, in which these proteins are involved.

The group includes laboratories of molecular biology and protein chemistry to support the high resolution structural studies. The group also has access to a state-of-the-art biophysical equipment for structural studies at medium and low resolution, including the NMR spectrometer of the Instituto de Estructura de la Materia.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, BIO99-0867 (1999-2002)
- DGICYT, PB97-1237 (1998-2001)
- Human Frontier Science Program, EC RG0307/1998-M (1998-2001)
- FEDER (1999-2002)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Calvete, J.J., Thole, H.H., Raida, M., Urbanke, C., Romero, A., Grangeiro, T.B., Ramos, M.V., Almeida da Rocha, I.M., Guimarães, F.N., and Cavada, B.S. (1999). Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1430, 367-375.

- Cuevas P, Lozano R.M., and Giménez-Gallego, G. (1999). Suppression of acidic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis by the antigrowth activity of 1,3,6-naphthalene-trisulphonate. *Neurol. Res.* 21, 191-194.
- Cuevas, P, Carceller, F, Martínez-Coso, V., Cuevas, B., Fernández-Ayerdi, A., Reimers, D., Asín-Cardiel, E., and Giménez-Gallego, G. (1999). Cardioprotection from Ischemia by fibroblast growth factor: role of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Med. Res.* 4, 517-524.
- Cuevas, P, Carceller, F, Reimers, D., Cuevas, B., Rosa M. Lozano, R.M., and Giménez-Gallego, G. (1999). Inhibition of intra-tumoral angiogenesis and glioma growth by the fibroblast growth factor inhibitor 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurol. Res.* 21, 481-487.
- Cuevas, P, Martínez-Coso, V., Xiaobing, F, Orte, L., Reimers, D., Giménez-Gallego, G., Forssmann, W.G., and Saenz de Tejada, I. (1999). Fibroblast growth factor protects the kidney against ischemia-reperfusion injury. *Eur. J. Med. Res.* 4, 1-8.
- Cuevas, P, Reimers, D., Díaz, D., Lozano, R.M., and Giménez-Gallego, G. (1999). Apoptosis of glioma cells induced by the fibroblast growth factor inhibitor 1,3,6-Naphthalenetrisulfonate. *Neurosc. Lett* 275 149-151.
- Fernández-Recio, J., Romero, A., and Sancho, J. (1999). Energetics of a hydrogen bond (charged and neutral) and of a cation-interaction in apoflavodoxin. *J. Mol. Biol.* 29, 319-330.
- Fuertes, M.A., Berberich, C., Lozano, R.M., Giménez-Gallego, G., and Alonso, C. (1999). Folding stability of the kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) from *Leishmania Infantum*. *Eur. J. Biochem.* 260, 559-567.
- González-Barroso, M.M., Fleury, C., Jiménez, M.A., Sanz, J.M., Romero, A., Boullaud, F, and Rial, E. (1999). Structural and Functional study of a conserved region in the uncoupling protein UCP1: the three matrix loops are involved in the control of transport. *J. Mol. Biol.* 292, 137-149.
- Lindahl, B., Westling, C., Giménez-Gallego, G., Lindahl, U., and Salmivirta, M. (1999). Common binding sites for amyloid fibrils and fibroblast growth factor-2 in heparan sulfate from human cerebral cortex. *J. Biol. Chem* 274, 30631-30635.
- Rosa-Fraile, M., Sampedro, A., Varela, J., García-Peña, M., and Giménez-Gallego, G. (1999). Identification of a peptide from mammal albumins responsible for enhanced pigment production by group B Streptococci. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 425-426.
- Varela, P.F., Solis, D., Díaz-Mauriño, T., Kaltner, H., Gabius, H.-J., and Romero, A. (1999). The 2.15 Å crystal structure of CG-16, the developmentally regulated homodimeric chicken galectin. *J. Mol. Biol.* 294, 537-549.
- Buche, A., Ramírez, J.M., and Picorell R. (2000). Effects of acid pH and urea on the spectral properties of the LHII antenna complex from the photosynthetic *Ectothiorhodospira* sp. *Eur. J. Biochem.* 267, 3235-3242.
- Calvete, J.J., Jürgens, M., Marcinkiewicz, C., Romero, A., and Schrader, M. (2000). Disulphide-bond pattern and molecular modelling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin 51 antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. *Biochem. J.* 345, 573-581.
- Cuevas, P, and Giménez-Gallego, G. (2000). Fibroblast growth factor and hydrocephalus. *Neurol. Res.* 22, 102-104.
- Cuevas, P, Carceller, F, Martínez-Coso, V., Asín-Cardiel, E., and Giménez-Gallego, G. (2000). Fibroblast growth factor cardioprotection against ischemia-reperfusion injury may involve K⁺ATP channels. *J. Med. Res.* 5, 145-149.
- Cuevas, P, Carceller, F, Reimers, D., and Giménez-Gallego, G. (2000). Fibroblast growth factor-1 inhibits medial smooth muscle cells apoptosis after balloon injury. *Neurol. Res.* 22, 185-188.
- Guzmán-Casado, M., Sánchez-Ruiz, J.M., El Harrous, M., Giménez-Gallego, G., and Parody-Morreale, A. (2000). Energetics of myo-inositol hexasulfate binding to human acidic fibroblast growth factor. Effect of ionic strength and temperature. *Eur. J. Biochem.* 267, 3477-3486.
- Lostao, A., El Harrous, M., Daoudi, F, Romero, A., Parody-Morreales, A., and Sancho, J. (2000). Dissecting the energetics of the Apoflavodoxin-FMN complex. *J. Biol. Chem.* 275, 9518-9526.
- Lozano, R. M., Pineda-Lucena, A., González, C., Jiménez, M. A., Cuevas, P., Redondo-Horcajo, M., Sanz, J. M., Rico, M., and Giménez-Gallego, G. (2000). Non-mitogenic, vasodilatory, ischemia-protector and neuromodulatory acidic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 39, 4982-4993.
- Reimers, D., Prieto, R., Giménez-Gallego, G., Cuevas, P, and Barrio, L.C. (2000). Acidic fibroblast growth factor inhibits junctional communication of Schwann cells in culture. *Neurol. Res.* 22, 685-69.
- Ständker, L., Bräulke, T., Mark, S., Mostafavi, H., Meyer, M., Höning, S., Giménez-Gallego, G., and Forssmann, W.G. (2000). Partial IGF affinity of circulating N- and C-terminal fragments of human insulin like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and the disulfide bonding pattern of the C-terminal IGFBP-4 domain. *Biochemistry* 39, 5082-5088.
- Varela, E., Böckle, B., Romero, A., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2000). Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochim. Biophys. Acta* 1476, 129-138.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Jiménez, M.A., Lozano, R.M., Giménez Gallego, G. Activation of fibroblast growth factors by heparin functional analogs: A nuclear magnetic resonance study. (2000) En *Methods in Molecular Medicine*. Ashton. Ed. Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA

Biología Molecular de Bacterias Gram-positivas

Molecular Biology of Gram-positive Bacteria

PALOMA LÓPEZ GARCÍA

Jefe de Grupo / Group Leader
Investigadora de Carrera / Staff Scientist

PILAR FERNÁNDEZ DE PALENCIA (Desde III-1999)

Investigadora Contratada / Research Associate

PALOMA ACEBO PAÍS (Desde IV-1999)

B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

MAURICIO MARTÍN (Desde IX-1999 hasta IV-2000)

Investigador Visitante / Visiting Scientist

MÓNICA AMBLAR ESTEBAN (Hasta IX-2000)

NIEVES GARCÍA QUINTANS
B. Predoctorales / Graduate Students

M^a ANGELES CORRALES GONZÁLEZ

Personal Técnico / Technician



Palabras clave: Bacterias lácticas, *Streptococcus pneumoniae*, regulación de la expresión génica, utilización de citrato, proteína fluorescente verde

Keywords: Lactic acid bacteria, *Streptococcus pneumoniae*, regulation of gene expression, citrate utilization, green fluorescent protein

Sistemas de utilización de citrato de bacterias lácticas

Systems of citrate utilisation in lactic acid bacteria

El cometabolismo de citrato y azúcares durante las fermentaciones lácteas conlleva a la producción del compuesto diacético, que contribuye al aroma y sabor de quesos y mantequillas. Nuestro grupo está caracterizando la utilización de citrato por dos bacterias lácticas *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* y *Leuconostoc paramesenteroides*.

Citrate is co-metabolised with sugars during dairy fermentations, generating diacetyl. This compound is responsible for the aroma and the flavour of butter and cheese. Our group is characterizing at the molecular level the citrate utilization by two lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* and *Leuconostoc paramesenteroides*.

Sistema de transporte de citrato de *L. diacetylactis*

Citrate transport system in *Lactococcus lactis*

Este sistema está codificado por el operón plasmídico *citQRP*, cuya expresión está regulada a nivel transcripcional (inducción por estrés ácido) y a nivel post-transcripcional. Durante este bienio hemos estudiado la regulación post-transcripcional del operón, mediante un análisis comparativo en *L. lactis* y *Escherichia coli*. Hemos determinado que en *E. coli* la expresión de la proteína reguladora *CitR* (cuyas señales

This system is encoded by the plasmidic *citQRP* operon and its expression is regulated at the transcriptional (induction by acidic stress) and post-transcriptional levels. During this bienium, we have characterized the post-transcriptional regulation of the operon through a comparative analysis in *L. lactis* and *Escherichia coli*. We have shown that expression of the *CitR* regulator (whose translational signals are included in a complex

de traducción están incluidas en una estructura secundaria) está controlada por la acción antagonista de dos endorribonucleasas. RNasa E procesa el mRNA *cit* corriente arriba de *citR* y dentro de la estructura secundaria. Esta catalisis incrementa la traducción y como consecuencia provoca una represión de la síntesis de la citrato permeasa P (CitP). RNasa III introduce un corte en el sitio de unión a los ribosomas de *citR*, impidiendo la expresión del gen y conllevando un incremento de los niveles de CitP en la célula. Hemos identificado la RNasa III de *L. lactis* mediante hibridación de Western con anticuerpos frente a su homónima de *E. coli*. Nuestros resultados y los de otros autores han revelado la existencia de actividad del tipo RNasa E en *L. lactis* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, aunque se ha determinado la secuencia completa del genoma de estos dos microorganismos gram-positivos no se ha detectado ningún producto génico homólogo al de *rnc* de *E. coli*. Estas observaciones sugieren que análogos pero no homólogos de la RNasa E de *E. coli* existen en bacterias gram-positivas y cumplen su función esencial en el degradosoma. Nos proponemos caracterizar las endorribonucleasas de *L. lactis* y determinar su influencia en la expresión génica utilizando como sistema modelo el operón *cit*.

Utilización de citrato por *Leuconostoc paramesenteroides*

Hemos mostrado que el operón *citMCDEFGRP*, presente en un plásmido de 30 kb, es responsable de la utilización de citrato en *Leuconostoc paramesenteroides*. Hemos clonado y determinado las secuencias de nucleótidos del operón y del gen *citI* localizado delante y con polaridad divergente. El operón codifica la citrato permeasa y las enzimas citrato liasa y oxalacetato decarboxilasa, que catalizan las dos primeras etapas del metabolismo de citrato. El gen *citI* codifica la proteína CitI, que es homóloga a reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia de SorC. El análisis transcripcional del operón y de *citI* ha permitido identificar las señales de iniciación y terminación de los transcritos, y determinar que el citrato induce su transcripción. El análisis del destino del mRNA del operón ha mostrado que su expresión está regulada a nivel post-transcripcional por procesamiento en cuatro estructuras secundarias complejas. Estudios de complementación en *E. coli* indican que CitI es un activador responsable de la regulación transcripcional. Hemos purificado la protei-

secondary structure) is controlled by the antagonistic action of two *E. coli* endoribonucleases. RNase E cleaves the *cit* mRNA upstream of *citR* and within the secondary structure. This catalysis allows synthesis of CitR and results in repression of citrate permease P (CitP) synthesis. RNase III cleavage at the ribosomal binding site of *citR*, impairs its expression, turns off regulation of expression of *cit* operon and as a consequence increases levels of CitP in the cell. We have detected the RNase III of *L. lactis* by Western blot with antibodies against *E. coli* RNase III and cloned the *rnc* gene. RNase E-like cleavages have been detected by us and other authors in *L. lactis* and in *Bacillus subtilis*. However, no counterpart of the *E. coli* RNase E has been identified by homology although the entire genome of these two gram-positive microorganisms has already been sequenced. These observations suggest that analogues but not homologues of *E. coli* RNase E could be included in the essential RNA degradosome of gram-positive bacteria. We intend to characterise the function of lactococcal endoribonucleases in gene expression, using as a model the *cit* operon.

Citrate utilisation by *Leuconostoc paramesenteroides*

We have established that the *citMCDEFGRP* operon, carried by a 30 kb plasmid, is required for citrate utilisation in *Leuconostoc paramesenteroides*. We have cloned and determined the nucleotide sequence of the operon and the *citI* gene, which is located upstream and divergently of *citMCDEFGRP*. The operon encodes the citrate permease P and the enzymes catalysing the two first steps of citrate metabolism (citrate lyase and oxalacetate decarboxylase). The *citI* gene encodes the CitI protein, which is homologous to transcriptional regulators belonging to the SorC family. The transcriptional analysis of the operon and *citI* has allowed to identify the start and end sites of transcription, and to establish that expression of the genes is induced by citrate. Analysis of the fate of *cit* mRNA has shown a post-transcriptional regulation by processing at four complex secondary structures. Analysis of the fate of *cit* mRNA has shown a post-transcriptional regulation by processing at four complex secondary structures. Complementation studies in *E. coli* indicate that CitI is an activator responsible for the transcriptional regulation. CitI has been purified and studies of protein-DNA interactions are in progress.

na CitiI y se han iniciado estudios de interacción proteína-DNA.

Desarrollo de sistemas de detección fluorescente de bacterias gram-positivas

Esta línea se inició en 1999 y se está desarrollando en colaboración con el grupo del Profesor Manuel Espinosa del CIB. Para establecer los sistemas de detección se empleó la proteína autofluorescente verde (GFP), codificada por el gen *gfp* de la medusa *Aequorea victoria*. La expresión de GFP en *Streptococcus pneumoniae* se logró subclonando el gen *gfp* bajo el control del promotor inducible P_M del gen neumocócico *malM*, que está implicado en la utilización de maltosacáridos). Se han obtenido plásmidos recombinantes que confieren fluorescencia a *S. pneumoniae*. pLS70GFP está basado en el plásmido movilizable pMV158 y puede ser transferido por conjugación y por transferencia plasmídica. pLS1GFP y pLS1RGFP están basados en el plásmido de amplio espectro de huéspedes pLS1 y han sido transferidos a *Lactococcus lactis*, microorganismo al cual confieren fluorescencia. El plásmido pLS70GFP contiene el gen *gfp* flanqueado por regiones del cromosoma de *S. pneumoniae*. Por ello, hemos podido transferir el gen *gfp* al genoma bacteriano mediante transformación cromosómica. La expresión del gen *malM* está regulada en *S. pneumoniae*. El responsable de esta regulación es el represor transcripcional MalR, producto del gen cromosómico *malR*, que inhibe la expresión del gen *malM* cuando *S. pneumoniae* se crece en medio conteniendo sacarosa. La represión no tiene lugar, o es parcial, cuando *S. pneumoniae* se crece en medios conteniendo maltosa o sacarosa y maltosa. Hemos establecido una correlación entre los niveles de fluorescencia, la masa celular y la dosis génica en las estirpes silvestre (R61) y deficiente en MalR (Rc19) portadoras del plásmido pLS70GFP o inserciones cromosómicas conteniendo la fusión P_M -*gfp*. Además, en R61 la expresión del gen *gfp* es inducible, mientras que en Rc19 la expresión es constitutiva. En todos los casos la fluorescencia celular puede ser detectada por espectrometría y microscopía de fluorescencia. El plásmido pLS1RGFP contiene el gen *malR* bajo el control del promotor *Ptet* y la fusión P_M -*gfp*. Este plásmido permite la expresión génica controlada (inducción máxima en cultivos crecidos en

Development of fluorescence detection systems for gram-positive bacteria

This line of research was started in 1999 and it has been developed in collaboration with the group of Professor Manuel Espinosa (CIB). To establish the detection systems we have utilised the green fluorescent protein (GFP). This protein is encoded by the *gfp* gene from *Aequorea victoria*. The expression of GFP was accomplished in *Streptococcus pneumoniae* by subcloning of the *gfp* gene under the control of the inducible promoter P_M of the pneumococcal *malM* gene (involved in maltose utilisation). We have constructed recombinant plasmids able to confer fluorescence to *S. pneumoniae*. pLS70GFP is based in the mobilizable plasmid pMV158 and it can be transferred by conjugation or plasmid transfer. pLS1GFP and pLS1RGFP are based in the broad host range pLS1 vector and confer fluorescence to *Lactococcus lactis* upon transfer. Plasmid pLS70GFP contains the *gfp* gene flanked by regions of the *S. pneumoniae* chromosome. For this reason, we have been able to transfer the *gfp* gene to the bacterial genome by chromosomal transformation. Expression of *malM* gene is regulated in *S. pneumoniae*. This regulation is mediated by the MalR transcriptional repressor, encoded by the chromosomal *malR* gene. MalR inhibits expression of *malM* upon bacterial growth in presence of sucrose. Repression does not take place or is partial upon growth in the presence of maltose or maltose plus sucrose. We have established a correlation of levels of fluorescence, cellular mass and gene dosage in wild-type R61 and MalR deficient Rc19 strains carrying pL70GFP or P_M -*gfp* chromosomal insertions. In all cases fluorescence was detected by fluorescence spectroscopy and microscopy. Moreover, *gfp* expression was inducible or constitutive in R6 or Rc19 strains, respectively. Plasmid pLS1RGFP harbours the *malR* gene under the control of the *Ptet* promoter and the P_M -*gfp* fusion. Therefore, this plasmid allows controlled gene expression in *S. pneumoniae*. Maximal induction or total repression in cultures grown in maltose or in sucrose, independently of the bacterial strain. The study of strains harbouring pLS1RGFP has allowed us to establish that *gfp* gene and its product GFP can be used as reporters to detect gene expression in growth cultures of *S. pneumoniae* and *L. lactis*. Therefore, GFP encoded by our constructions could be used to perform ecological studies of *L. lactis* and *S. pneumoniae* strains, detection of gene

presencia de maltosa y represión total en presencia de sacarosa) en *S. pneumoniae* independiente de la estirpe utilizada. El estudio de estirpes portadoras de este plásmido nos ha permitido comprobar que el gen *gfp* y su producto GFP pueden ser utilizados como "reporters" para estudiar expresión génica en *S. pneumoniae* y *L. lactis*.

Hemos estandarizado con nuestras construcciones la detección directa de GFP en medios de cultivo. Así, GFP expresada a partir de nuestras construcciones puede ser utilizada para realizar estudios ecológicos de estirpes de *S. pneumoniae* y *L. lactis*, para detectar expresión génica en tiempo real y sobreexpresar proteínas.

El desarrollo futuro de esta línea contempla la obtención de estirpes fluorescentes modificadas del microorganismo patógeno *S. pneumoniae* para analizar la transmisión de resistencias a antibióticos y desarrollar nuevos agentes antibacterianos inhibidores de los sistemas de dos componentes. Así mismo, se pretende obtener estirpes de bacterias lácticas modificadas de interés para las industrias lácteas y de alimentos.

expression in real time and overproduction of proteins.

The future development of this research line includes construction of fluorescent and modified pneumococcal strains for: 1) the analysis of transmission of antibiotic resistances and 2) the development of new antibacterial agents, inhibitors of the two component systems. Furthermore, we intend to obtain genetic engineered lactic acid bacteria useful for dairy and food industries.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- CAM, 06G/002/96 (1997-1999)
- UE, BIO4-CT98-0424 (1998-2000)
- CICYT, BIO1999-1335-CE (1999-2000)
- CAM, 08.3-0028 (1998-2000)
- CICYT, BIO97-0347 (1997-2000)
- UE-CICYT, FEDER 2FD-1025 (1999-2001)
- UE, QLRT-1999-30543 (2000-2003)
- CICYT, AGL2000-1530-C02 (2000-2004)

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- **Mónica Amblar Esteban.** Análisis mutacional del dominio de actividad nucleásica 5'-3' de la DNA polimerasa I de *Streptococcus pneumoniae*. Universidad Complutense de Madrid. 2000. Directora: Paloma López García.

Patentes/*Patents*

- Fernández de Palencia, P., Acebo, P., Espinosa, M., and López, P. (2000). Mejoras introducidas en la patente principal N° 9901813 por Procedimiento de obtención y detección de bacterias gram-positivas fluorescentes. Solicitud de Adición de Pat. Española N° 20000020000CA.
- Nieto, C., Acebo, P., Fernández de Palencia, P., Corrales, M.A., Espinosa, M., and López, P. (1999). Procedimiento de obtención y detección de bacterias gram-positivas fluorescentes. Solicitud de Pat. española N° 9901813.
- Nieto, C., Acebo, P., Fernández de Palencia, P., Corrales, M.A., Espinosa, M., and López, P. (2000). Procedure for obtaining and detecting fluorescent gram-positive bacteria. Solicitud de Patente PCT N° PCT/ES00/00305.
- Nieto, C., López, P., and Espinosa, M. (2000). Título. Mejoras introducidas en la patente principal 9901813 por Procedimiento de obtención y detección de bacterias gram-positivas fluorescentes. Solicitud de Adición de Pat. española N°. 200000518.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

- Aguilar, P.S., López, P., and de Mendoza, D. (1999). Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the delta 5 desaturase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 7028-7033.
- Drider, D., García-Quintáns, N., Santos, J.M., Arraiano, C.M., and López, P. (1999). A comparative analysis of the citrate permease P mRNA stability in *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 115-122.
- Martín, M., Corrales, M.A., de Mendoza, D., López, P., and Magni, Ch. (1999). Cloning and molecular characterization of the citrate utilization *citMCDEFGRP* cluster of *Leuconostoc paramesenteroides*. *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 238.
- Acebo, P., Nieto, C., Corrales, M.A., Espinosa, M., and López, P. (2000). Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* cells harbouring single or multiple copies of the gene encoding the green fluorescent protein. *Microbiology.* 146, 1267-1273.
- Drider, D., Santos, J.M., García-Quintáns, N., Arraiano, C.M., and López, P. (2000). The role of *Escherichia coli* RNase E and RNase III in the processing of the *citQRP* operon mRNA from *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 337-346.
- Fernández de Palencia, P., Acebo, P., Nieto, C., Espinosa, M., and López, P. (2000). Expression of green fluorescent protein in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 229-234.
- Martín, M., Magni, Ch., López, P., and de Mendoza, D. (2000). Transcriptional control of the citrate-inducible *citMCDEFGRP* operon encoding genes involved in citrate fermentation in *Leuconostoc paramesenteroides*. *J. Bacteriol.* 182, 3904-3912.
- Nieto, C., Fernández de Palencia, P., López, P., and Espinosa, M. (2000). Construction of plasmid vectors overexpressing the green fluorescent protein in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid.* 43, 205-213.

Bioquímica de *Leishmania*. Péptidos Antibióticos Eucarióticos

Biochemistry of *Leishmania*. Eukaryotic Antibiotic Peptides

LUIS I. RIVAS LÓPEZ

Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ESTHER GUERRERO POZUELO (Desde VI-1999)

JOSÉ SAUGAR CRUZ

ROSARIO MANCEBO LOZANO (Desde IV hasta IX-1999)

CRISTINA CHICHARRO GONZALO (Desde XI-1999 hasta VIII-2000)

JUAN R. LUQUE ORTEGA

ANA CABRANES AZCONA (Desde III hasta IX-1999)

B. Predoctorales / Graduate Students

Palabras clave: *Leishmania*, bacterias gram negativas, péptidos antibióticos eucarióticos, péptidos acilados, NOS2

Optimización de la actividad leishmanicida de péptidos híbridos cecropina A-melitina

Los péptidos antibióticos eucarióticos constituyen una nueva alternativa a la quimioterapia, debido a su amplio espectro de actuación y a la dificultad de desarrollo de resistencias al dirigirse a sistemas esenciales y altamente conservados del patógeno. Su síntesis química es en general asequible, y permite la optimización de estructuras, una de cuyas estrategias es la combinación de motivos estructurales homólogos a partir de diferentes péptidos antibióticos en una molécula quimérica.

Se ha continuado la optimización de estructuras sintéticas híbridas cecropina-A melitina en colaboración con el Dr. D. Andreu (Univ de Barcelona). Los analogos leishmanicidas activos más cortos sintetizados son de 11 residuos. Se ha estudiado la variación de la actividad por acilación con ácidos grasos de cadena larga del péptido CA(1-7)M(2-9). La acilación con ácido láurico en la posición K1, tanto en el α - como en el ϵ -NH₂ incrementa su efectividad sobre los amastigotes 15 veces, pero la actividad bactericida no incrementó significativamente. Cuando el proceso se realiza en la posición K7, hay una destrucción total de la actividad del péptido así como de su capacidad de formar estructuras helicoidales. Los péptidos

Keywords: *Leishmania*, gram-negative bacteria, antibiotic peptides, peptide acylation, NOS2

Optimization of the antibiotic activity of cecropin A-melittin peptides against *Leishmania*

Eukaryotic antibiotic peptides and their synthetic analogues are a promising alternative to the growing incidence of antibiotic resistance. Development of resistance against them is quite restricted as they target essential and well-conserved systems of the pathogen. As their chemical synthesis is quite affordable, optimization of structures is easily done. One strategy is the synthesis of chimeric molecules from homologous structural motifs from different peptides. In collaboration with Dr. D. Andreu we studied the effect of fatty acid acylation on the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin A-melittin hybrid peptide. Acylation with lauric acid at 1 α or 1 ϵ -NH₂ increased 15 fold activity against amastigotes, whereas the antibacterial activity did not undergo significant improvement. The acylated peptide increased its permeabilization effect on neutral phospholipid vesicles and also induced NOS2 expression in murine macrophages; by contrast, the non-acylated analogue was devoid of this activity. Acylation at the ϵ -NH₂ group of 7-Lys decreased dramatically both the microbicidal activity and the α -helical propensity of the peptide.

actúan mediante permeabilización de la membrana plasmática del parásito, induciendo pérdida de la homeostasis intracelular. La acilación en KI incrementa considerablemente la permeabilización de vesículas constituidas por fosfolípidos neutros, así como induce la expresión de NOS2 en macrófagos murinos, ausente en el análogo no acilado.

Búsqueda de nuevos péptidos antibióticos con actividad leishmanicida

Se ensayaron las actividades leishmanicidas de otras estructuras peptídicas aisladas de organismos o de análogos sintéticos de las mismas. La permeabilización de la membrana plasmática del promastigote es esencial para la actividad de los análogos de magainina 2 y PGLa (péptidos de anfibios) y la tionina de trigo, sin intervención significativa de otras estructurales intracelulares. Sin embargo, la actuación de indolicidina (neutrófilos bovinos), histatina (saliva humana), defensina de plantas y el lipodepsipéptido bacteriano siringomicina, implican otros mecanismos adicionales a la permeabilización de membrana incluyendo inhibición de la cadena respiratoria del parásito. También se estudió las relaciones estructura-función en la siringomicina, de las cuales el átomo de halógeno y su naturaleza en la posición 4-Thr así como la estructura cíclica del péptido son esenciales para su actividad antibiótica sobre *Leishmania*.

La función protectora del lipofosfoglicano, el polisacárido aniónico más abundante en la superficie del promastigote del promastigote de *Leishmania*; contra los péptidos eucarióticos policatiónicos, fue estudiada mediante mutantes en la biosíntesis del mismo y sus revertientes. El grado de protección logrado varía dependiendo del péptido estudiado; siendo más elevado para los péptidos lineales que para aquellos con ciclos intracatenarios.

Péptidos cecropina A-melitina como alternativa a la multiresistencia en patógenos oportunistas nosocomiales

Acinetobacter baumannii constituye uno de los patógenos nosocomiales oportunistas más frecuentes en pacientes inmunodeprimidos. Su capacidad para adquirir multiresistencia a antibióticos convencionales ha causado una situación clínica preocupante. En colaboración con el Dr M. López.Brea

Screening of new eukaryotic leishmanicidal peptides

In order to find better lead antibiotic peptides active on Leishmania, several natural and synthetic peptides were assayed on both forms of the parasite. An essential step of the lethal mechanism for the synthetic analogues of the amphibian peptides magainin 2 and PGLa, and for plant thionins, is the permeabilization of the plasma membrane of the parasite. By contrast, other additional targets were required for the leishmanicidal activities of human saliva histatin, indolicidin and the bacterial lipodepsipeptide syringomycin, including inhibition of the respiratory chain of the parasite. Lipophosphoglycan is an anionic polysaccharide and the major non-lipidic component of the promastigote surface. Its protective role against cationic antibiotic peptide were tested by defective biosynthetic mutants and their revertants. The protection afforded by this molecule is much higher for linear peptides than for those with internal cycle.

Cecropin A-melittin hybrid peptides as an alternative for multiresistance in nosocomial opportunistic pathogens

Acinetobacter baumannii is one of the most abundant nosocomial opportunistic pathogen for immunodepressed patients. Its large capacity to acquire resistance against classical antibiotics has decreased the range of active antibiotics to polymyxin B. In collaboration with Dr. M. López-Brea (Microbiology Department, Hospital de la Princesa) we had evaluated the antibiotic activity of several eukaryotic antibiotic peptides against reference and multiresistant *Acinetobacter* strains. The cecropin A-melittin hybrid peptide CA(1-8)M(1-18) displayed the higher activity (MIC = 2 μ M for all the tested strains). Nevertheless, the peptide permeabilized the outer membrane at only 0.25 μ M by interaction with lipopolysaccharide. As expected, the lethal mechanism was directly related to permeabilization of the inner membrane. No significative differences were observed for its activity when tested against reference and multiresistant strains. The cecropin A-melittin hybrid peptide showed a faster kinetics and better activity on metabolically resting bacteria when compared with polymyxin B.

(Servicio de Microbiología del Hospital de la Princesa), se ha estudiado el mecanismo de acción de diferentes péptidos antibióticos sobre cepas de referencia y multirresistentes. El análogo CA(1-8)M(1-18) resultó el más activo. Su concentración inhibitoria mínima es de 2 μM , aunque la permeabilidad de la membrana externa tiene lugar a 0.25 μM . Es igualmente activo frente a cepas multirresistentes, independientemente del patrón de multirresistencia. El péptido penetra en la bacteria mediante un mecanismo de autopromoción, mediante el cual primero interacciona con el lipopolisacárido de la membrana externa, desorganizando la estructura de la misma y posterior depolarización y permeabilización de la membrana interna. Su eficacia en la neutralización del lipopolisacárido es semejante a la polimixina B, el único fármaco universalmente activo contra todas las cepas de esta bacteria. El CA(1-8)M(1-18) presenta una cinética más rápida que la polimixina y es más efectivo que ésta en condiciones de baja actividad metabólica de la bacteria.

Organismos Financiadores/Funding Agenci

- UE, IC18-CT97-0213 (1998-2000)
- FIS, 99/0025-02 (1998- 2001)
- CAM, 08.2/0029.2/1998 (1998-2000)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Carmen Chicharro Gonzalo.** Papel de la cisteína proteinasa de amastigotes de *Leishmania pifanoi* en la relación parásito hospedado. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Director: Luis I. Rivas.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Andreu, D., and Rivas, L. (1999). Animal antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 415-433.
- Rivas, L., and Ganz, T. (1999). Eukaryotic antibiotic peptides: more than a membrane business. *Drug Discovery Today* 4, 254-256.
- Rivas, L., and Andreu, D. (2000). Péptidos antibióticos eucarióticos: ¿Reliquia evolutiva o panacea terapéutica? *Rev. Esp. Quimioterap* 13, 17-19.

Las Proteínas de División Celular FtsZ y Tubulina.
Métodos Bioinformáticos
Tubulin and FtsZ as Protein Assembly Machines and Cytostatic Targets.
Biocomputing Methods

JOSÉ M. ANDREU MORALES

Jefe de Grupo / *Group Leader*

Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

J. FERNANDO DÍAZ PEREIRA

Investigador Contratado / *Research Associate*

JUAN MANUEL PALACIOS MORENO (Desde II-2000)

B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

MARÍA ANGELA OLIVA BLANCO (Desde VII-2000)

PABLO CHACÓN MONTES (Hasta VI-1999)

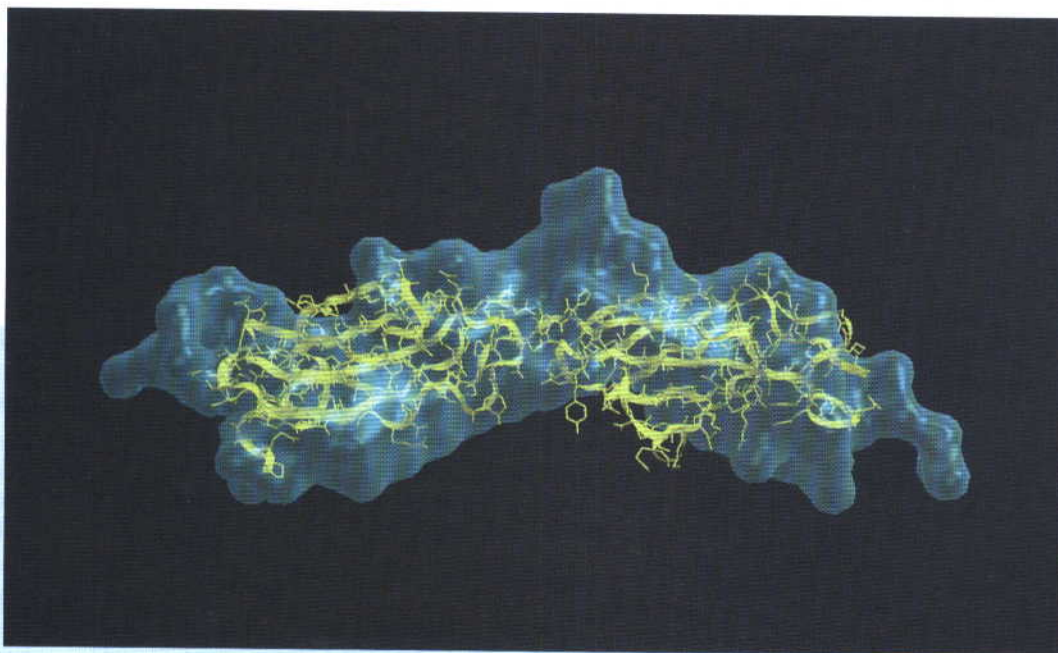
JUAN A. EVANGELIO PALOMO (Hasta IV-1999)

SILVIA ZORRILLA LÓPEZ (Hasta XII-1999)

B. Predoctorales / *Graduate Students*

ROSA MARTÍNEZ-DALMAU (Hasta X-2000)

Personal Técnico / *Technician*



Palabras clave: Interacciones funcionales de proteínas, FtsZ, tubulina, Taxol, reconstrucción estructural, Dispersión de Rayos X en solución, Dinámica molecular

Activación y ensamblaje de FtsZ y tubulina

Nuestro laboratorio estudia las interacciones funcionales de las proteínas de división celular FtsZ (arqueas y eubacterias) y tubulina (eucariotas), utilizando abordajes complementarios en ambos sistemas, y nuevos métodos biofísicos y computacionales.

La tubulina ensambla formando los microtubulos, componentes del citoesqueleto eucariótico esenciales para el transporte citoplásmico y la división celular, y diana de agentes antimitóticos como el Taxol, la vinblastina y la colchicina. FtsZ es la proteína principal del anillo de septación de los procariotas, y una diana potencial de nuevos antibióticos. FtsZ y tubulina constituyen una familia de GTPasas estructurales homólogas cuya función consiste en autoensamblar e interactuar con otros componentes celulares. Ambas proteínas se activan por unión de GTP, que al ensamblar se hidroliza a GDP desactivando la proteína.

Las primeras etapas del ensamblaje de FtsZ de *E. coli* consisten en su auto-asociación en oligómeros lineales inducida (de forma parecida a tubulina) por Mg^{2+} , cuya energética se ha caracterizado mediante centrifugación analítica (Rivas et al & Andreu, *J Biol Chem.* 275, 11740-11749, 2000). La activación de la FtsZ de *Methanococcus jannaschii* por el nucleótido unido se ha investigado mediante dinámica molecular y mutagénesis dirigida. Las simulaciones *in silico* indican que el fosfato gamma del GTP tira del bucle T3 (Gly88-Gly99) hacia una conformación más compacta que con GDP. La existencia del cambio conformacional inducido por nucleótido en el bucle T3 se ha confirmado con un mutante con un único triptófano (T92W-W319Y) cuya fluorescencia es sensible al GTP o GDP unido a FtsZ. Dich cambio estructural podría inducir curvatura en un filament de FtsZ con GDP, explicando la desestabilización del polímero; un mecanismo semejante puede operar en tubulina (Díaz et al & Andreu, *J. Biol. Chem.* 276, 17307-17315, 2001). Creemos que la asociación de oligómeros lineales de FtsZ entre si y con otras proteínas del septo asociadas a la membrana debe conducir a su ensamblaje bidimensional, todavía no caracterizado, y la formación y

Keywords: Protein functional interactions, FtsZ, tubulin, Taxol, structural reconstruction from solution scattering, Molecular dynamics

Activation for assembly of FtsZ and tubulin

Our research group focuses on the functional interactions of cell division proteins FtsZ (archaea and eubacteria) and tubulin (eukarya), employing complementary approaches as well as novel biophysical and computational methods.

Tubulin assembles forming cytoskeletal microtubules, which are essential for cytoplasmic transport and cell division, and constitute the targets of the antimitotic agents Taxol, vinblastine and colchicine. FtsZ is the main protein of the prokaryotic cell division ring, and a potential target for new antibiotics. FtsZ and tubulin constitute a family of homologous structural GTPases, whose main function is to self-assemble and interact with other cellular components. Both proteins are activated by GTP binding, which is hydrolysed to GDP upon assembly.

The first stages of assembly of FtsZ from *E. coli* entail the nearly isodesmic Mg^{2+} -induced association of monomers into linear oligomers (in a similar fashion to tubulin) whose energetics has been characterized by analytical ultracentrifugation (Rivas et al & Andreu, *J. Biol. Chem.* 275, 11740-11749, 2000). The activation of FtsZ from *Methanococcus jannaschii* by the bound nucleotide has been studied with molecular dynamics methods and site-directed mutagenesis. The *in silico* simulations indicate that the gamma-phosphate of GTP pulls loop T3 (Gly88-Gly99) into a more compact conformation than with GDP. The existence of a nucleotide-induced structural change in loop T3 has been confirmed with a mutant (T92W-W319Y) whose single tryptophan residue shows large differences in fluorescence emission depending on the nucleotide bound to FtsZ monomers. Loop T3 is located at a side of the contact interface between two FtsZ monomers in the FtsZ filament model. Such a structural change may bend the GDP-filament by pushing against helix H8 of the next monomer, thus explaining the polymer destabilization and generating force on the membrane during cell division. A related curvature mechanism may operate in tubulin activation (Díaz et al. & Andreu, *J. Biol. Chem.* 276, 17307-17315, 2001). The association of linear FtsZ oligomers among themselves and with other membrane bound cell division proteins should lead to its (poorly known) bidimensional assembly, and to the formation

regulación del anillo de división entre las bacterias hijas. Actualmente estamos determinando la forma de ensamblaje y la activación catalítica (GTPasa) de nuevos mutantes en las que se creen constituyen las interfases principales de contacto entre moléculas de FtsZ. El conocimiento detallado de estas interacciones de FtsZ, y la búsqueda de pequeñas moléculas que las modifiquen, es de utilidad previsible para el desarrollo de nuevos inhibidores de la división bacteriana.

Reconocimiento molecular de Taxol por los microtúbulos

El Taxol es un ligando que activa la tubulina de modo que es capaz de autoensamblar sin necesidad de GTP. El Taxol se une preferentemente a la tubulina ensamblada en microtúbulos, en una zona de la subunidad beta próxima a la de contacto lateral entre sus protofilamentos, y los estabiliza. La unión de Taxol a unas pocas de las moléculas de tubulina de cada microtúbulo es suficiente para suprimir su característica dinámica de crecimiento y decrecimiento terminal. Esto interfiere con funciones del citoesqueleto microtubular importantes para la célula, tales como el transporte de otras proteínas al núcleo (lo que modifica la activación transcripcional de genes reguladores de la proliferación celular), provoca la desorganización del centrosoma, y bloquea los microtúbulos del huso mitótico en metafase. Dichos cambios son responsables en último extremo de la muerte celular durante la terapia antitumoral con antimitóticos. Se están descubriendo nuevas sustancias de orígenes dispares que interactúan con el sitio de unión de Taxol de los microtúbulos y mimetizan sus efectos. Por otra parte, se desconoce si los muy abundantes sitios de unión de Taxol de los microtúbulos podrían interactuar con hipotéticos reguladores endógenos de la división celular.

Para esclarecer los mecanismos de reconocimiento molecular de Taxol y sus biomiméticos por los microtúbulos utilizamos como sondas taxoides fluorescentes, desarrollados junto con varios laboratorios del CSIC. Hemos determinado el esquema cinético y las constantes de velocidad de reacción de unión a microtúbulos de dos derivados fluorescentes de Taxol en posición 7, Flutax-1 y Flutax-2, que se unen con alta afinidad al sitio de Taxol de los microtúbulos. El mecanismo de unión consiste en una reacción bimolecular rápida, seguida de al menos dos reajustes monomoleculares, etapas que han sido caracterizadas mediante métodos de flujo detenido. Las constantes de velocidad de la primera reacción (que se bloquea

and regulation of the septation ring between the daughter bacterial cells. We are presently addressing the assembly and catalytic (GTPase) activation of new FtsZ mutants at the main contact interfaces between FtsZ molecules. An in-depth knowledge of these interactions and searching for small molecules which may modulate them, should be useful in the development of new inhibitors of bacterial cell division

Molecular recognition of Taxol by microtubules

Taxol, a widely employed antitumour agent, is a tubulin ligand which activates this protein, bypassing the requirement of GTP binding for microtubule assembly. Taxol preferentially binds to assembled beta-tubulin at a site near the lateral contact between microtubule protofilaments. The binding of Taxol to a few tubulin molecules per microtubule suppresses the characteristic microtubule end-growth and disassembly dynamics. Dynamics suppression interferes with important functions of the microtubule cytoskeleton like the microtubule-mediated transport of other proteins to the cell nucleus (which modifies the transactivation of genes regulating cell proliferation), and produces centrosomal impairment, and blocking of the spindle microtubules in metaphase. These changes ultimately lead to cell death during antitumour treatment with antimetabolites. New chemically unrelated substances from diverse sources which interact with the taxol binding site of microtubules and mimic its effects are being discovered. On the other hand, it is not known whether the ubiquitous Taxol binding sites of microtubules might interact as well with hypothetic endogenous regulators of eukaryotic cell division.

In order to gain knowledge on the mechanisms of molecular recognition of Taxol and its bio-mimetics by microtubules we use fluorescent taxoids which have been developed in collaboration with several CSIC laboratories. These ligands (Flutax-1, Flutax-2) are specific probes of Taxol binding sites of in vitro assembled and cellular microtubules. They bind reversibly and with high affinity to microtubules. Their kinetic binding mechanism consists of a fast bimolecular reaction, which can be blocked by docetaxel, followed by at least two monomolecular rearrangements. The bimolecular rate constants of the first step are in the order of $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 37 C, which implies a half-life of 50 ms for the reaction at a physiological sites concentration of 10 micromolar (Black and white Figure) indicating that the binding site is directly accessible from the microtubule surface. The rate

por docetaxel), medidas por los cambios de intensidad de fluorescencia, son del orden de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37 C, lo que implica una vida media de la reacción de unión de 50 ms a concentraciones de sitios 10 micromolar, del orden de las fisiológicas (Figura blanco y negro). Una segunda etapa, mas lenta, se ha medido por el cambio de anisotropía de fluorescencia de las sondas. La reacción inversa es la etapa limitante de disociación. Una tercera etapa consiste en un aumento de 2 nm en el diámetro de los microtúbulos, que se ha medido mediante dispersión de rayos X a bajo ángulo. Los resultados sugieren que la primera etapa es la unión de la parte de Taxol de las sondas y la segunda consiste en una inmovilización del fluoróforo. La cinética de la reacción indica que el sitio de unión de Taxol es directamente accesible en los microtubulos. Esto contrasta con su localización en el lumen en el modelo actual de microtubulos (Figura blanco y negro BC), lo que lleva a considerar posibles mecanismos alternativos en los que el sitio de unión se encuentra accesible desde la superficie de los microtubulos (Figura blanco y negro AD) (Díaz et al. & Andreu, J. Biol. Chem. 275, 26265-26276, 2000)

Reconstrucción de la estructura de macromoléculas en solución mediante dispersión de rayos X y algoritmos genéticos

La determinación de las estructuras en solución de proteínas y complejos macromoleculares a resoluciones baja y media es fundamental para comprender sus mecanismos funcionales, y para salvar el "hueco de resolución" existente entre las estructuras con resolución atómica y su organización e interacciones en complejos macromoleculares funcionales. La reconstrucción de una estructura a partir de un determinado perfil de dispersión de rayos X (SAXS) en solución constituía un problema formidable con soluciones ambiguas. Sin embargo, diseñamos una aproximación mediante modelado *ab initio* de SAXS con un algoritmo genético que explora eficientemente un espacio configuracional constituido por cientos de esferas (de 0.3 nm de diámetro) que contenga la posible solución y evoluciona a modelos convergentes cuyo perfil de dispersión se ajusta óptimamente al perfil experimental (Chacón et al. & Andreu, Biophys. J. 74, 2760-2774, 1998). Para validar este método hemos reconstruido a partir de sus perfiles de SAXS las correspondientes formas y tamaños de mioglobina, troponina C, espermadhesina PSP-I/PSP-II, quimotripsinógeno A, superoxi-

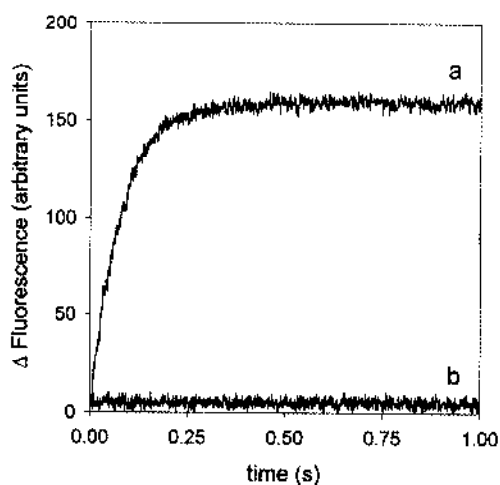
constant of binding of Taxol itself is not smaller. The second binding step entails the immobilization of the fluorescein moiety, which is detected by fluorescence anisotropy. The reversal of this reaction is the rate-limiting step of dissociation. In a third step there is a 2-nm increase in the diameter of microtubules, which has been measured by small angle X-ray scattering. How taxoids may reach at such a high rate with a binding site located at the lumen of the current microtubule model and modify the microtubule protofilament number are still unresolved puzzles (Black and white Figure), which leads to consider alternative microtubule structures in which the Taxol binding site is directly accessible from the microtubule surface (Díaz et al. & Andreu, J. Biol. Chem. 275, 26265-26276, 2000).

Macromolecular shape and size determination with X-ray solution scattering and genetic algorithms

The determination of the low and mid resolution solution structures of proteins, macromolecular complexes and assemblies, is central in understanding their functional mechanisms, and bridging the resolution gap between atomic resolution structures and biomolecular organisation, interactions and function.

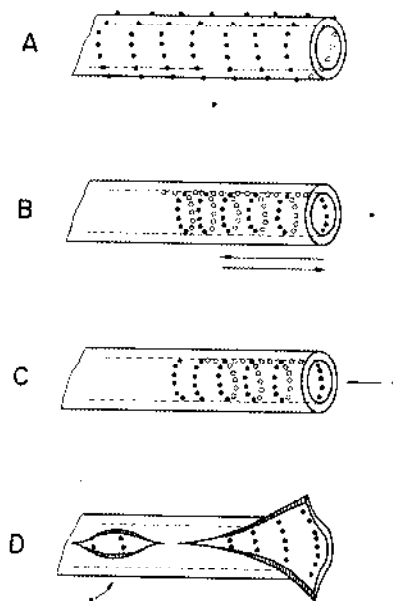
Reconstruction of structures from experimental solution scattering profiles was a formidable problem with ambiguous solutions. We devised an *ab initio* SAXS modelling approach with a genetic algorithm that efficiently searches configurational space made of several hundreds beads (of 0.3 nm diameter) and evolves convergent models best fitting the scattering profile upon Debye calculation, (Chacón et al. & Andreu, Biophys. J. 74, 2760-2774, 1998). We have reconstructed from experimental 2-3 nm resolution X-ray solution scattering profiles the corresponding shapes and sizes of myoglobin, troponin C, spermadhesin PSP-I/PSP-II, chymotrypsinogen A, superoxide dismutase, ovalbumin, tubulin, nitrite reductase, catalase, the structural change of troponin C upon dissociation of the two high affinity Ca^{2+} , and the solution model structure of a tandem pair of fibronectin type III cytoplasmic domains of integrin $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ before determination of its crystal structure (see colour Figure), among other. The number of beads in the models is correlated with the protein molecular mass. The shape and approximate dimensions of each protein have been retrieved by a set of 10 solution models, essentially superimposable with the available crystal structures. It can not be claimed that the results obtained are the unique

do dismutasa, ovalbumina, tubulina, nitrito reductasa, catalasa, el cambio estructural de la troponina C inducido por la disociación de los dos cationes Ca^{2+} de alta afinidad, y un modelo estructural en solución de dos dominios citoplásmicos de la integrina alfa6beta4 (Figura en color) antes de la determinación de su estructura cristalográfica, entre otras. En cada uno de estos casos se obtuvieron la forma y tamaño aproximados en 10 modelos prácticamente superponibles con las estructuras cristalográficas disponibles. La reconstrucción estructural con SAXS puede considerarse como un procedimiento numérico de transformación de los perfiles de dispersión unidimensionales en estructuras modelo tridimensionales discretas; constituye un poderoso método de resolución media, complementario de microscopía y reconstrucción de imagen. Es aplicable a especies moleculares monodispersas orientadas aleatoriamente en la solución, desde proteínas pequeñas a relativamente grandes. Podrían utilizarse aproximaciones semejantes a otros sistemas, como productos de ensamblaje, complejos proteína-ácido nucleico, y la determinación de cambios estructurales funcionales en solución utilizando la información de la estructura cristalográfica (Chacón et al & Andreu, *J. Mol. Biol.* 299, 1289-1320, 2000). (<http://akilonia.cib.csic.es>)



family of solutions fitting the scattering profile, however, other possibly existing solutions appear of low probability. Structural reconstruction from SAXS can be regarded as a procedure of effective numerical transformation of the one-dimensional scattering profiles into discrete three-dimensional model structures. In this sense, similar algorithms might be useful for related numerical problems other than the inverse scattering problem, such as direct structural determination with X-ray diffraction. In addition, the molecular envelope of a protein from solution scattering can also be employed in *ab initio* phasing X-ray diffraction. Shape and size *ab initio* determination with solution scattering is a powerful mid-resolution approach, complementary to electron microscopy and image analysis. It is applicable to monodisperse randomly oriented species, from relatively small to large proteins. Subjects of further study should include the use of crystal structure information to automatically determine functional structural changes from solution scattering, time resolution and the analysis of ordered macromolecular assemblies (Chacón et al. & Andreu, *J. Mol. Biol.* 299, 1289-1320)

(<http://akilonia.cib.csic.es>)



Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB95-0116 (1996-1999)
- MEC, BIO99-0859-c03-02 (1999-2002)
- CAM, 07B/0025/1999 (2000-2000)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Juan Angel Evangelio Palomo**. Interacciones de microtubulos con taxoides fluorescentes. Universidad Complutense de Madrid, 1999. Director: J.M. Andreu.
- **Pablo Chacón Montes**. Estructura de proteínas en solución a partir de su perfil de dispersión de rayos X mediante un algoritmo genético. Universidad Complutense de Madrid, 1999. Directores: J.M. Andreu y F. Morán (UCM).
- **Lucía Arregui García-Rovés**. Citoesqueleto microtubular del ciliado psicrófilo *Euplotes focardii*: organización, isotipos y modificaciones funcionales de tubulina. Universidad Complutense de Madrid, 1999. Directores: S. Serrano (UCM) y J.M. Andreu.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Jimenez, M.A., Evangelio, J.A., Aranda, C., López-Brauer, A., Andreu, D., Rico, M., Lagos, R., Andreu, J.M., and Monasterio, O. (1999). Helicity of alpha(404-451) and beta(394-445) tubulin C-terminal recombinant peptides. *Protein Science* 8, 788-799.
- Kuppens, S., Díaz, J.F., and Engelborghs, Y. (1999) Characterization of the hinges of the effector loop in the reaction pathway of activation of ras-proteins. Kinetics of binding of beryllium trifluoride to V29G and I36G Ha-ras-p21. *Prot. Sci.* 8(9), 1860-1866.
- Modig, C., Olsson, P.E., Barasoain, I., de Inés, C., Andreu, J.M., Roach, M.C., Ludueña, R.F., and Wallin, M. (1999) Identification of beta III and beta IV tubulin isotypes in cold-adapted microtubules from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Antibody mapping and cDNA sequencing. *Cell Motil. Cytoskeleton* 42, 315-330.
- Peyrot, V., Barbier, P., Sarrazin, M., and Andreu, J.M. (1999) Chirality and spectroscopic changes induced by the recognition of ethyl 5-amino-2-methyl-1,2-dihydro-3-phenylpyrido[3,4-b]pyrazin-7-yl carbamate analogs by tubulin. *Photochem Photobiol.* 70, 710-718.
- Bras, W., Diakun, G.P., Denny, R.C., Ferrero, C., Levine, Y.K., and Diaz, J.F. (2000). Scattering from biopolymers with helical symmetry in solution. *Appl. Cryst.* 33, 659-663.
- Cadot, P., Díaz, J.F., Proost, P., Van Damme, J., Engelborghs, Y., Stevens, E.A.M., and Cuypens, J.L. (2000). Purification and Characterization of Bet v9, an 18-kDa allergen of birch (*Betula verrucosa*) pollen. Identification as a cyclophilin. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 10, 286-291.
- Chacón, P., Díaz, J.F., Morán, F., and Andreu, J.M. (2000). Reconstruction of protein shape with x-ray solution scattering and a genetic algorithm. *J. Mol. Biol.* 299, 1289-1320.
- Díaz, J.F., Escalona, M.M., Kuppens, S., and Engelborghs, Y. (2000). Role of the switch II region in the conformational transition of activation of Ha-ras-p21. *Prot. Sci.* 9, 361-368.
- Díaz, J.F., Strobo, R., Engelborghs, Y., Souco, A.A., and Andreu, J.M. (2000). Molecular recognition of taxol by microtubules: Kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site. *J. Biol. Chem.* 275, 26265-26276.
- Gajate, C., Barasoain, I., Andreu, J.M., and Mollinedo, F. (2000). Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent MTC: protection by Bcl-2 and Bcl-XL, and cell cycle arrest. *Cancer Res.* 60, 2651-2659.
- Maya, A.B.S., del Rey, B., Pelaez Lamamie de Clairac, R., Caballero, E., Barasoain, I., Andreu, J.M., and Medarde, M. (2000). Design, synthesis and cytotoxic activities of naphthyl analogues of combretastatin A-4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 2549-2552.
- Rivas, G., López, A., Mingorance, J., Ferrandiz, M.J., Zorrilla, S., Minton, A.P., Vicente, M., and Andreu, J.M. (2000) Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for assembly. *J. Biol. Chem.* 275, 11740-11749.
- Sillen, A., Díaz, J.F., and Engelborghs, Y. (2000) A step towards the prediction of the fluorescence lifetimes of tryptophan residues in proteins based on structural data. *Prot. Sci.* 9, 158-169.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Bras, W., Diakun, G.P., Denny, R.C., Gleeson, A., Ferrero, C., Levine, Y.K., and Diaz, J.F. (2000) Scattering from magnetically oriented microtubule biopolymers. En *Scattering from polymers: Characterization by X-rays, neutrons and light scattering*. (Ed. Cebe, P., Hsiao, B.S., Lohse, D.J.) ACS Symp Series vol 739, pp 341-353.

Parasitología Molecular

Molecular Parasitology

VICENTE LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA
Jefe de Grupo / Group Leader

SORAYA TALADRIZ MORENO (DESDE III-2000)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

M. JESÚS RAMIRO IBAÑEZ
TOBIAS HANKE SCHAEFEER
B. Predoctorales / Graduate Students

BEATRIZ GUTIÉRREZ-SOLAR BRAGADO
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: *L. infantum*, vacunas recombinantes, DNA polimerasa beta, Topoisomerasa II, replicación y reparación del DNA

Desarrollo de una vacuna recombinante frente a la infección por *L. infantum*

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria producida por distintas especies del género *Leishmania*. Esta enferme-

Keywords: *L. infantum*, recombinant vaccines, DNA replication and repair, DNA polymerase beta, Topoisomerase II

Development of a recombinant vaccine against *L. infantum* infection

Leishmaniasis is a worldwide parasitic disease, endemic in Spain, with an intermediate reservoir in Europe, the dog. Due to the remarkable increase in the number of patients in the last

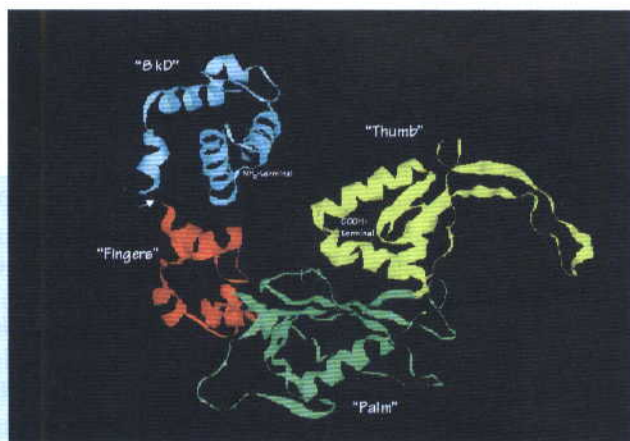


Figura: Predicción de la estructura tridimensional de la DNA polimerasa beta de *Leishmania infantum*.

Figure: Structure prediction for DNA polymerase beta from *Leishmania infantum*

dad, endémica en Asia, América y la zona Mediterránea tiene como huésped mamífero principal en Europa el perro. El porcentaje de infestación de los perros en España es del 10% aproximadamente con zonas de incidencia mucho mayor (hasta el 30%). Esta enfermedad está asociada con los pacientes inmunodeprimidos. De acuerdo con los estudios llevados a cabo en el modelo murino, el desarrollo o la contención de la enfermedad esta relacionada con el proceso de presentación de antígeno y con el equilibrio entre las subpoblaciones Th1 y Th2. Así, la proliferación de células Th1 se correlaciona con la contención de la enfermedad y la de las células Th2 con el progreso de la misma.

Con el fin de intentar cortar el ciclo del parásito en el huésped principal se está desarrollando una vacuna frente a la enfermedad en el perro. Para ello, se está utilizando el gen de una proteína del parásito análoga del receptor de proteína quinasa C activada (LACK) que denominamos p36/LACK. Se han llevado a cabo pruebas de protección cruzada en el modelo murino (Balb/c) y se han medido además los niveles de interleuquinas (IL-4, IFN γ) y la producción de anticuerpos específicos frente a la proteína p36/LACK (IgG1, IgG2a) con objeto de detectar el grupo celular que prolifera durante la infección experimental. Se han realizado experimentos con diferentes construcciones del gen de la p36/LACK que se ha utilizado bien "desnudo" o incluido en un virus vaccinia atenuado. Los resultados obtenidos han mostrado un nivel de protección muy superior a los proporcionados hasta ahora por extractos del parásito o por antígenos de la superficie del mismo (gp63). En estos momentos se están llevando a cabo experimentos de protección en los perros con objeto de determinar la capacidad de protección en el huésped mamífero en Europa.

Estructura y función de la DNA polimerasa beta de *L. infantum*

Los Tripanosomátidos presentan funciones excepcionales como la transcripción policistronica, el "trans-splicing" de los RNA precursores o la edición de los RNA mitocondriales. La cromatina no se condensa formando cromosomas y la membrana nuclear permanece durante la división celular. Las polinucleótido fosforilasas son una de las actividades enzimáticas que aparecieron más tempranamente en la evolución. El mecanismo de adición de nucleótidos está muy conservado

years in Southern Europe it has been declared as emerging disease by the WHO. The development of a vaccine appears as one of the more effective ways to fight against the disease. It has been obtained the encoding gene of a protective antigen p36/LACK that induces high levels of protection against the infection at the murine model. The present research work being carried out at the Molecular Parasitology laboratory attempts the development of a recombinant vehicle to test the protective effect against the *L. infantum* infection in dogs as well as the determination of basic parameters of the CD4+ cells (Th1 and Th2) in the response against the experimental infection. The results obtained in the murine model have shown that p36/LACK induces protection in higher levels than those induced by classical Leishmania extracts and parasite surface antigens (gp63). At present, the protective effect of the LACK antigen is being tested in the european reservoir, the dog.

Structure and function of the DNA polymerase beta from *L. infantum*

The Trypanosomatidae display exceptional biological features such as polycistronic transcription, trans-splicing of precursor RNAs and transcriptional editing of mitochondrial RNAs. The chromatin does not condense into chromosomes and the nuclear envelop remains during cell division. The polynucleotide polymerases are probably one of the earliest enzymatic activities appearing in evolution. Irrespective of the variety of DNA polymerases involved in the DNA replication and repair, they display several common features. There are also structural similarities between the different DNA dependent polymerases according to their crystal structures. The polymerization domain displays a hand shape structure with fingers, palm and thumb subdomains that define a groove to hold the DNA.

The DNA polymerase beta (Pol beta), a member of the family X of DNA polymerases, seems to participate in several DNA transactions in vivo, e.g. DNA replication, recombination and base excision DNA repair (BER). DNA synthesis that may be also catalyzed by Pol delta or Pol epsilon in addition to Pol beta. The average of Pol beta error rates are clearly higher than those determined for other DNA polymerases involved in DNA replication. This error-prone activity is higher for the alternative BER than for the simple BER mechanism. The functional meaning of this error-prone behaviour is not clear and several hypothesis

entre las distintas polimerasas. Todas las estructuras enzimáticas descritas hasta ahora muestran una estructura similar del tipo "hand shape" con subdominios en la proteína denominados como "dedos", "palma" y "pulgar" preparadas para llevar a cabo su función con la molécula de DNA.

Las DNA polimerasas beta (pol beta), pertenecen a la familia X de las DNA polimerasas y participan en la replicación, la recombinación y la excisión de bases de la reparación del DNA (BER). Este proceso puede ser simple, con la sustitución de un solo oligonucleótido dañado o alternativo en el que se sustituyen de dos a seis oligonucleótidos alterados. Aunque este proceso puede ser llevado a cabo por otras DNA polimerasas como pol delta y pol epsilon, el porcentaje de errores cometido en la reparación por pol beta es muy superior al de los mostrados por los otros enzimas. Existen varias hipótesis para explicar este hecho. Pol beta podría ser un agente mutagénico (como pol mu) o generador de variabilidad en la recombinación (VJD) como hacen las TdT. Datos recientes muestran que pol beta esta implicada en procesos de diferenciación en los mamíferos como la neurogénesis. *L. infantum* como la mayoría de los Tripanosomátidos utiliza la variabilidad como método de defensa frente a la acción de los fármacos antiparasitarios, lo que origina la mayoría de las recidivas en el tratamiento de estas enfermedades. Resulta pues de gran interés el estudio de los mecanismos de reparación en estos parásitos como posibles factores de variabilidad. Se ha procedido a la caracterización y clonación de la DNA polimerasa beta de *L. infantum* así como a la determinación de la estructura de la misma. La expresión del gen correspondiente está regulada a lo largo del ciclo celular del parásito y se correlaciona con la infectividad del mismo.

Caracterización de la Topoisomerasa II de *L. infantum*

Los mecanismos de replicación y reparación del DNA de *L. infantum* resultan interesantes, no solo desde el punto de vista básico, sino también como blanco de posibles drogas antiparasitarias. Para conseguir un fármaco con actividad antiparasitaria efectiva es necesario que la molécula en cuestión presente una actividad de inhibición específica que la actividad inhibida sea esencial para el parásito y no pueda ser sustituida mediante la utilización de una vía metabólica alternativa.

have been proposed. Pol beta-like DNA polymerases may act as mutator agents as has been recently described for human Pol beta, or generating variability by addition of untemplated nucleotides at VDJ recombination intermediates, as it occurs with TdT. More recent data suggest that Pol beta could play a role in differentiation processes in mammals, i.e. in neurogenesis. *L. infantum*, as much of the Trypanosomatidae displays variability as a defense method against drug action. This causes most of the relapses in the treatment of the disease. The DNA polymerase beta from *L. infantum* has been identified and cloned. The expression of the encoding gene is regulated along the life cycle of the protozoon and correlates to the parasite infectivity.

Topoisomerasa II from *L. infantum*

In addition to the basic interest of the study of the DNA replication and repair in *L. infantum* those mechanisms and the enzymes involved in are well suited to be the specific target of anti parasitic drugs. In order to get a good antiparasitic drug, the candidate molecule has to fulfil several criteria. First, the inhibitory activity has to be specific. Second, the inhibited activity has to be essential for the life of the parasite and should not have any metabolic alternate way. In this context, the study of the Topoisomerasa II of *L. infantum*, responsible of the separation of the daughter DNA chains after replication fits all the requirements. This is an specific process, do not show any alternate way and the inhibition of the process is lethal for the parasite. *L. infantum*. Topoisomerasa II has been cloned and is being obtained in a recombinant form to characterize it. The expression of the encoding gene is being tracked along the parasite life cycle.

En este contexto, el estudio de la Topoisomerasa II responsable de la separación de las cadenas del DNA después de que se haya replicado resulta de gran interés ya que el mecanismo cumple todos los requisitos exigidos para el estudio de moléculas de acción antiparasitaria. Es un proceso específico cuya alteración o interrupción resulta letal para el parásito y no puede ser sustituido mediante la utilización de una vía alternativa. Se ha clonado el gen codificante de la Topoisomerasa II de *L. infantum* y se está procediendo a su caracterización y obtención en forma recombinante. Asimismo se está estudiando la expresión del gen durante el ciclo celular del parásito.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- FIS, 97/0492 (1997-1999)
- CAM, 08.2/0037/99 (1999)
- CICYT, BIO099-0853 (1999-2002)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Soraya Taladriz.** Clonación y caracterización molecular del gen codificante de la DNA polimerasa beta nuclear del protozoo *Leishmania infantum*. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Director: Dr.Vicente Larraga

Patentes/Patents

- Taladriz Moreno, S., and Larraga Rodríguez de Vera, V. (1999). DNA polimerasa de *Leishmania infantum*. Blanco de acción de moléculas con actividad antiparasitaria, inmunosupresora y antitumoral. S-9901877.
- Larraga, V., Hanke, T., Taladriz, S., and Ramiro, M.J. (2000). DNA Topoisomerasa II de *Leishmania infantum*. Blanco de acción de moléculas con actividad antiparasitaria. P 200001949.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Espinosa de los Monteros, J., Díaz, V., Toribio, M.A., Rodríguez-Farré, E., Larraga, V., Conde, J., Erick Clavería, L., and Muñoz, E. (1999). La investigación biomédica en España (II). Evaluación del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) a través de los proyectos de investigación financiados en el período 1988-1995 a centros de investigación, facultades y escuelas. *Medicina Clínica* 112, 225-235.
- Espinosa de los Monteros, J., Díaz, V., Toribio, M.A., Rodríguez Farré, E., Larraga, V., Conde, J., Erik Clavería, and Muñoz, E. (1999). La investigación biomédica en España (I). Evaluación del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) a través de los proyectos de investigación financiados en el período 1988-1995 a instituciones sanitarias asistenciales (hospitales). *Medicina Clínica* 112, 182-197.
- González-Aseguinolaza, G., Taladriz, S., Marquet, A., and Larraga, V. (1999). Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur.J.Biochem.* 259, 909-916.
- Taladriz, S., González-Aseguinolaza, G., Marquet, A., and Larraga, V. (1999). Cloning, molecular analysis and cell localisation of the p36/RACK analogue antigen from the parasite protozoon *Crithidia fasciculata* *FEBS letters* 443, 375-380.
- González-Aseguinolaza, G., Taladriz, S., Marquet, A., and Larraga, V. (2000). Cloning and molecular structure of the macrolides binding L17 ribosomal protein from the parasite *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* 86, 36-40.

Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-positivas

Replication and Expression of DNA in Gram-positive Bacteria

MANUEL ESPINOSA PADRÓN

Jefe de Grupo / Group Leader

Investigador de Carrera / Staff Scientist

GLORIA DEL SOLAR DONGIL

CONCEPCIÓN NIETO MAZARRÓN

Investigadoras Contratadas / Research Associates

TATIANA VENKOVA (XI-XII, 1999, y IV-VI-2000)

Investigadora Visitante / Visiting Scientist

MARIA EUGENIA FARIAS

B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

PALOMA ACEBO PAÍS (Hasta VII-1999)

ANA MARIA HERNÁNDEZ ARRIAGA

JOSÉ ÁNGEL RUIZ MASÓ

B. Predoctorales / Graduate Students

MARIA TERESA ALDA LÓPEZ

Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Replicación, represor transcripcional, plásmidos

Keywords: Replication, transcriptional repressor, plasmids

Replicación de la hebra líder del plásmido pMV158

Leading strand replication of plasmid pMV158

El plásmido de estreptococos pMV158 replica por círculo rodante y tiene alto número de copias ($N=20$). La replicación se inicia por el ataque nucleofílico de la proteína iniciadora, RepB, sobre el enlace fosfodiéster del dinucleótido GpA. Este ataque está mediado por el residuo Y99. RepB genera un enlace covalente transitorio ya que se conserva la quiralidad del fosfato implicado en la reacción de corte y cierre. Se han determinado varios parámetros en las reacciones de corte y cierre de RepB, usando como sustrato DNA superenrollado (dsDNA) y oligonucleótidos de cadena sencilla (ssDNA) que contienen el sitio de corte. Se ha clonado y secuenciado el gen cromosomal *pcrA* de *Streptococcus pneumoniae*. Este gen codifica la proteína PcrA, una helicasa esencial que está implicada en la replicación de la hebra líder del DNA del plásmido.

*Plasmid pMV158 is a high copy number streptococcal plasmid ($N=20$) that replicates by the rolling circle mechanism. Replication of the leading strand initiates by means of the plasmid-encoded protein, RepB, which exerts a nucleophilic attack on the phosphodiester bond of the di-nucleotide GpA. This cleavage is mediated by the Y99 residue. Upon cleavage, RepB generates a transient covalent bond since the chirality of the phosphate involved in the nicking-closing reaction is maintained. We have determined several parameters of these reactions using as substrates supercoiled (ds) or single-stranded (ss) DNA harbouring the nick site. We have cloned and sequenced the chromosomal gene *pcrA* of *Streptococcus pneumoniae*. This gene encodes an essential helicase that is involved in replication of the leading strand of pMV158.*

Síntesis de la cadena retrasada de pMV158

La replicación de la hebra retrasada se inicia en el origen de cadena retrasada, *sso*. La iniciación se realiza por la RNA polimerasa del huésped que sintetiza un pequeño RNA primer. La síntesis del DNA en esta hebra continúa por intervención de la DNA polimerasa I, seguida de síntesis de DNA y la conversión de ssDNA en dsDNA por la DNA polimerasa III. pMV158 posee dos *sso*, *ssoA* y *ssoU*. Se ha realizado la caracterización física y funcional del *ssoU*. El *ssoU* es funcional en *S. pneumoniae*, en *Bacillus subtilis*, y en *Staphylococcus aureus*. Ninguno de los dos *sso* de pMV158 es funcional en *Escherichia coli*. La conversión ssDNA a dsDNA está mediada por la RNA polimerasa del huésped, y hemos determinado la existencia de promotores que actúan como tales solamente en DNA de cadena sencilla. Se ha mapeado el RNA primer que inicia la síntesis de la cadena retrasada en el *ssoA*, y se ha caracterizado la unión de la RNA polimerasa al *ssoU* de pMV158. Asimismo, se ha clonado el *sso* del colifago de cadena sencilla fd en pMV158, y se ha demostrado su funcionalidad en *E. coli*. Sin embargo, esta funcionalidad no contribuyó a disminuir la alta tasa de pérdida de pMV158 en este huésped.

Control de la replicación de pMV158

El control del número de copias (N) de pMV158 se ejerce sobre la síntesis de RepB y está mediado por dos productos plasmídicos: el represor transcripcional CopG y el RNA contratranscrito, ctRNA II. El gen *copG* codifica un polipéptido de 45 aminoácidos que regula N por represión del promotor único para los genes *copG* y *repB*, los cuales forman un operón. Parte de este promotor incluye un operador simétrico de 13bp que es el sitio primario de unión de CopG, si bien la proteína cubre una región de unos 50 pares de bases. Se ha estudiado la formación de complejos CopG-DNA, usando como sustrato DNA bicatenario de 55-mer que contiene toda la diana de CopG. Se han aislado dos mutantes espontáneos en *copG* que se traducen en plásmidos con $N \gg 20$. Se han construido mutantes en *copG* con deleciones internas dirigidas a cuatro regiones: hélices alfa, láminas beta, y estructuras desordenadas. La región que codifica el ctRNA II constituye el principal determinante de incompatibilidad de pMV158. Se ha realizado mutagénesis dirigida al promotor del ctRNA II (PctII), obteniéndose un mutante que tiene $N=20$, debido a dos fenómenos coincidentes: i) disminución en la síntesis de

Lagging strand synthesis in pMV158

Replication of the pMV158 lagging strand initiates in a region termed single-strand origin, sso, by synthesis of a small RNA primer mediated by the host RNA polymerase. DNA synthesis mediated by DNA polymerase I, and it is continued by the DNA polymerase III which performs the conversion of the ssDNA intermediate into dsDNA plasmid forms. Plasmid pMV158 has two sso, ssoA and ssoU. We have performed a physical and functional analysis of the pMV158-ssoU. This origin is functional in several Gram-positive bacteria (S. pneumoniae, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus). Neither the ssoA or the ssoU are functional in the Gram-negative host Escherichia coli. Conversion of ssDNA to dsDNA is mediated by the host RNA polymerase. We have determined the existence of promoters acting as such only on ssDNA. We have mapped the primer RNA for initiation of lagging strand replication in the ssoA, and also have mapped the RNA polymerase binding site to the pMV158-ssoU. We have cloned, into pMV158, the sso from the ss-coliphage fd and have shown that this sso is functional in the recombinant. However, the fd-sso did not participate in the stabilization of pMV158 in E. coli.

Replication control of pMV158

*Plasmid pMV158 copy number (N) control is exerted on the synthesis of the initiator RepB protein, and it is mediated by two plasmid-encoded products: the transcriptional repressor CopG and the countertranscribed (antisense) RNA, ctRNA II. Gene copG encodes the 45-amino acids protein CopG. CopG regulates N by repression of the single promoter of the copG-repB operon. Part of this promoter includes a symmetric operator element, which is the primary CopG binding site, although the protein is able to protect a 50-bp region. Generation of CopG protein-DNA complexes has been studied using a dsDNA of 55-mer that contains all the CopG target. We have isolated and characterized two mutations in copG that results in plasmids with very high copy numbers ($N \gg 20$). In addition, by site-directed mutagenesis, we have constructed mutations in gene copG, which have internal deletions directed toward four regions: alpha helices, beta-sheet and random coils. We have determined the crystal structure of CopG alone or in complex with a 19-mer ds-oligonucleotide containing the target of CopG. The second element, the ctRNA II, is the main incompatibility determinant of the plasmid. We have performed site-directed mutagenesis to the promoter of the *trnAII* gene,*

RNA II ($N > 20$), y ii) disminución en la síntesis de RepB ($N < 20$). Además, se ha aislado y caracterizado un mutante que afecta al espaciado entre las cajas -35 y -10 del promotor PctII ($N \gg 20$). Se han definido con precisión los parámetros implicados en el control del número de copias de pMV158. Se ha comenzado a definir las regiones del RNA II implicadas en su terminación.

Mobilización de pMV158

El plásmido pMV158 no es conjugativo aunque sí movilizable, pudiendo ser transferido a otros huéspedes mediante funciones suministradas por plásmidos conjugativos co-residentes, como pIP501. pMV158 contiene una secuencia de iniciación de transferencia de DNA (*oriT*), donde la proteína MobM introduce su corte específico. Se ha purificado MobM y se ha mostrado que la proteína se une covalentemente al extremo 5' de su DNA diana, dejando un extremo 3'-OH libre. Se ha definido la región del *oriT* por métodos genéticos y moleculares, observándose que la región protegida por MobM frente a rotura por la DNasa I incluye el *oriT* y solapa con su promotor, sugiriendo que la proteína auto-regula su síntesis. Se ha mostrado que MobM es funcional en *Lactococcus lactis*, y que pMV158 es también transferible entre estirpes de *E. coli*, siendo movilizado por los plásmidos RP4 o R388.

El regulón *mal* de *Streptococcus pneumoniae*.

Se ha purificado el regulador transcripcional MalR de *S. pneumoniae*, y se han caracterizado las interacciones de MalR con su DNA diana. La afinidad de MalR por el operador para el operón *malMP* es mayor que para el operador del operón *malXCD*. *In vitro*, la unión de MalR a su diana queda abolida por la presencia de maltosa. MalR se une a una secuencia palindrómica que también está presente en las secuencias diana de dos represores de *E. coli*, PurR y MalI. La región de unión de MalR al operón *malMP* incluye el promotor Pm y el operador Om, y el operón se induce, *in vivo*, por la presencia de maltosa en el medio de cultivo. Basándonos en esta propiedad, se han construido una serie de plásmidos vectores que llevan el gen que codifica la proteína fluorescente verde, GFP colocada bajo la región operadora/promotora (Pm/Om) del operón *malMP*. Se ha mostrado que esta proteína es funcional en *S. pneumoniae* y en *L. lactis*, siendo inducible por la presencia de maltosa.

and we have characterized a mutant that has $N=20$ due to the co-occurrence of two effects: i) reduction in the synthesis of RNA II ($N > 20$), and ii) reduction in the synthesis of RepB ($N < 20$). In addition, we have isolated and characterized another mutant that has a sub-optimal *rnaII* promoter activity, leading to plasmids with $N \gg 20$. The parameters involved in pMV158-copy number control have been precisely defined. We have started to work on the definition of regions of RNA II involved in its termination.

Mobilisation of pMV158

Plasmid pMV158 is not self-transmissible, but it can be mobilised between various hosts when some of the mobilisation functions are provided by a co-resident plasmid, such as pIP501. pMV158 harbours a sequence for the initiation of the conjugative transfer process (the *oriT*), where the pMV158-encoded protein MobM introduces the specific cleavage needed for the transfer process to initiate. Protein MobM has been purified, and the protein remains covalently attached to the 5'-end, leaving free the 3'-OH end. The *oriT* region has been defined by genetic and molecular procedures. Protein MobM protects a region encompassing the *oriT* and its own promoter from cleavage by DNase I, suggesting that the protein auto-regulates its own synthesis. We have shown that MobM is functional in *Lactococcus lactis*. In addition, pMV158 has been shown to be transmissible among *E. coli* strains by the functions provided by plasmids RP4 or R388.

The *mal* regulon of *Streptococcus pneumoniae*

We have purified the transcriptional regulator MalR from *S. pneumoniae*, and the interactions between MalR and its DNA target have been characterized. The affinity of MalR for the *malMP* operator is higher than that for the *malXCD* operon. *In vitro*, binding of MalR to DNA is abolished in the presence of the sugar maltose. MalR binds to a palindromic sequence which is also present in the targets of two *E. coli* repressors, namely PurR and MalI. The target of MalR in the *malMP* operon includes the promoter (Pm) and the operator (Om). *In vivo*, the operon is induced by the presence of maltose in the culture media. Based upon this feature, plasmids vectors harbouring the gene encoding the green fluorescent protein (GFP) have been constructed. In these plasmids, the Pm/Om promoter/operator region of the *malMP* operon directs synthesis of GFP. We have shown that GFP is functional in *L. lactis* and in *S. pneumoniae*, and that synthesis of GFP is inducible by maltose.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, BIO97-0347 (1997-1999)
- UE, BIO4-CT98-0099 (1998-2001)
- CSIC-UNAM, "MARINA BUENO" (1999-2001)
- CICYT, FEDER 2FD97-0518 (1998-2001)
- CAM, 07/B/0030/1999 (1999-1999)
- MCYT BMC-2000-0550 (2000-2003)
- CAM, 07/B/49/99 (1999-1999)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Paloma Acebo País.** Control de la replicación del plásmido pMV158 Universidad Complutense de Madrid, 1999. Directores: Manuel Espinosa y Gloria del Solar. Calificación: Sobresaliente cum laude.

Patentes/Patents

- Fernández de Palencia, P., Acebo, P., Espinosa, M., y López, P. (2000). Mejoras introducidas en la patente principal nº 9901813 por Procedimiento de obtención y detección de bacterias Gram-positivas fluorescentes. Número 2000002000CA.
- Nieto, C., Acebo, P., Fernández de Palencia, P., Corrales, M.A., Espinosa, M., and López, P. (1999). Procedimiento de obtención y detección de bacterias Gram-positivas fluorescentes. Número 9901813.
- Nieto, C., Acebo, P., Fernández de Palencia, P., Corrales, M.A., Espinosa, M., and López, P. (2000). Procedimiento de obtención y detección de bacterias Gram-positivas fluorescentes. Número PCT N° PCT/E500/00305.
- Nieto, C., López, P., and Espinosa, M. (2000). Mejoras introducidas en la patente principal 9901813 por Procedimiento de obtención y detección de bacterias Gram-positivas fluorescentes. Número 200000518.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Díaz-Orejas, R., y Espinosa, M. (1999). Elementos extracromosómicos: Así comienzan a replicarse. *Investigación y Ciencia Junio* 34-35.
- Farías, M.E., Grohmann, E., and Espinosa, M. (1999). Expression of the *mobM* gene of the streptococcal plasmid pMV158 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 403-410.
- Grohmann, E., Guzmán, L.M., and Espinosa, M. (1999). Mobilisation of the streptococcal plasmid pMV158: interactions of MobM protein with its cognate *oriT* DNA region. *Mol. Gen. Genet.* 261, 707-715.
- Kramer, M.G., Espinosa, M., Misra, T.K., and Khan, S.A. (1999). Characterization of a single-strand origin, *ssuU*, required for broad host range replication of rolling-circle plasmids. *Mol. Microbiol.* 33, 466-475.
- Acebo, P., Nieto, C., Corrales, M.A., Espinosa, M., and López, P. (2000). Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* cells harbouring single or multiple copies of the gene encoding the green fluorescent protein. *Microbiology* 146, 1267-1273.
- del Solar, G., and Espinosa, M. (2000). Plasmid copy number control: an ever growing story. *Mol. Microbiol.* 37, 492-500.
- Farías, M.E., and Espinosa, M. (2000). Conjugal transfer of plasmid pMV158: uncoupling of the pMV158 origin of transfer from the mobilisation gene *mobM*, and modulation of pMV158 transfer in *Escherichia coli* mediated by IncP plasmids. *Microbiology* 146, 2259-2265.
- Fernández de Palencia, P., Nieto, C., Acebo, P., Espinosa, M., and López, P. (2000). Expression of green fluorescent protein in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 229-234.
- Hernández-Arriaga, A.M., Espinosa, M., and del Solar, G. (2000). A functional lagging strand origin does not stabilize plasmid pMV158 inheritance in *Escherichia coli*. *Plasmid* 43, 49-58.
- Nieto, C., Fernández de Palencia, P., López, P., and Espinosa, M. (2000). Construction of a tightly regulated plasmid vector for *Streptococcus pneumoniae*: controlled expression of the green fluorescent protein. *Plasmid* 43, 205-213.

Contribuciones a Libros / Contributions to Books

- Espinosa, M., Cohen, S., Couturier, M., del Solar, G., Díaz-Orejas, R., Giraldo, R., Jániniere, L., Miller, C., Osborn, M., and Thomas, C.M. (2000). Plasmid replication and copy number control. *En: The Horizontal Gene Pool*. C.M. Thomas, Editor. Harwood Academic Publishers, Amsterdam. pp 1-47.

Fotobioquímica Vegetal Plant Photobiochemistry

PEDRO J. APARICIO ALONSO
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

MIGUEL A. QUIÑONES GÓMEZ
FEDERICO GUILLERMO WITT SOUSA
Investigadores Contratado / Research Associates

CRISTINA MORA NAVARRO (Desde IV-1999)
B. Predoctoral / Graduate Student

LUCAS OYA TARDÍO
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Microalgas, asimilación de nitrógeno, carbono y fósforo, fotorregulación por luz azul-UV, transporte de iones, tratamiento terciario de aguas superficiales

Fotoregulación del transporte de aniones monovalentes en *Monoraphidium braunii* y *Chlamydomonas reinhardtii*

Los componentes azul y UV de la iluminación solar, son esenciales para la activación de determinados procesos en algas y en plantas superiores. Entre ellos se encuentran el transporte de aniones monovalentes y la reducción asimilatoria de algunos elementos que constituyen nutrientes esenciales para el desarrollo de organismos fotosintéticos.

En los últimos años, nuestro grupo ha puesto de manifiesto que las entradas de las principales fuentes de nitrógeno (nitrato) y carbono (bicarbonato) en células del alga verde *Monoraphidium braunii*, dependen de la irradiación de las suspensiones celulares con luz azul o radiación UV. En ausencia de dicha radiación, es decir, cuando las algas se iluminan exclusivamente con luz roja, éstas son incapaces de tomar dichos nutrientes del medio.

Keywords: Microalgae, nitrogen and carbon assimilation, blue-UV light photoregulation, ion transport, tertiary treatment of surface waters

Photoregulation of monovalent anion transport in *Monoraphidium braunii*

In algae and higher plants, blue light and UV radiation are essential for some processes to occur. Among them are monovalent anion transport and assimilatory reduction of elements that are fundamental for the development of photosynthetic organisms. In recent years, our research group has shown that the uptakes of the main nitrogen and carbon sources (nitrate and bicarbonate) by *Monoraphidium braunii* cells, depends on the irradiation of cell suspensions with blue light or UV radiation. In the absence of those, that is when the algae are illuminated with only red light, they are unable to take up those nutrients from the medium. In the plasma membrane of *M. braunii* there are, at least, two monovalent anion transport systems whose activity depends on blue light. One of them is specific for bicarbonate

En la membrana plasmática de *M. braunii* existen, al menos, dos sistemas para el transporte de aniones monovalentes cuya actividad depende de luz azul. Uno de ellos es específico para el transporte de bicarbonato. La señal medioambiental que da lugar a la inducción de dicho transportador es una bajada en la concentración de CO₂ en el medio. Cambios en la concentración de bicarbonato o en el pH del medio no dan lugar a la biosíntesis de dicho sistema de transporte.

El segundo sistema de transporte para aniones monovalentes dependiente de luz azul es responsable, al menos, de la entrada de nitrato en las células. Este transportador está también involucrado en las entradas de nitrito y cloruro, u otros aniones monovalentes como bromuro o yoduro. Este sistema de transporte para nitrato se inhibe siempre que hay amonio presente en el medio. Por ello, la señal medioambiental que da lugar a su inducción es la desaparición del amonio del medio, no siendo necesaria la presencia de nitrato para que tenga lugar su biosíntesis.

Probablemente el fotorreceptor involucrado es de tipo flavínico y se encuentre localizado cerca de la membrana plasmática de *M. braunii*. Se están llevando a cabo trabajos para aislar y purificar vesículas de membrana plasmática de este alga para estudiar los sistemas de transporte y fotorreceptor(es) a nivel molecular.

En la membrana plasmática del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, hay al menos cuatro transportadores de alta afinidad para aniones nitrogenados (nitrato y nitrito). Los sistemas de transporte III y IV son específicos para nitrito y bi-específico para nitrato y nitrito, respectivamente. Recientemente, hemos demostrado que la biosíntesis de ambos sistemas sólo tiene lugar en presencia de luz azul. Cuando las algas se iluminan exclusivamente con luz roja, aunque sea de alta intensidad, son incapaces de sintetizar dichos sistemas de transporte. Sin embargo, la activación de los sistemas III y IV no requiere luz azul y las algas pueden tomar nitrito del medio en ausencia de dicha radiación. La regulación por luz azul de la inducción de ambos sistemas parece ser a nivel postranscripcional.

Sistemas de purificación con algas verdes de las aguas del medio rural

Todas las predicciones apuntan en una dirección en la que el agua puede llegar a ser un bien escaso para una población

uptake. The environmental signal that induces this system is a decrease in the external CO₂ concentration. The second blue light-dependent monovalent anion transport system is responsible for, at least, nitrate uptake. This transporter is also involved in the uptakes of nitrite and chloride, and probably other monovalent anions such as bromide or iodide. This system is inhibited whenever there is ammonium in the medium. Thus, the environmental signal for the induction of this transporter is the depletion of ammonium. The photoreceptor responsible for the blue light-dependence of anion uptake in *M. braunii* is probably a plasma membrane-bound flavoprotein. In *Chlamydomonas reinhardtii*, the inductions of systems III and IV (plasma membrane high-affinity nitrite and nitrite-nitrate uptake systems, respectively) are blue light-dependent. However, the activation of both transport systems does not require this low wavelength radiation.

Green alga-based water purification systems

High-quality water is becoming a commodity in a society where the population grows fast, increasing the production of contaminants. Research must be done towards methods that allow to re-use water after its passage through urban or agricultural areas. Recycled water must be free of solids in suspension, organic matter and mineral nutrients. The systems used nowadays do not remove N, P and S ions which, on the other hand are essential nutrients for photosynthetic organisms to grow. These compounds are accumulated in surface waters, leading to uncontrolled algal growth and eutrophication. This previously-purified water is not apt for human use and may be harmful for aquatic environments. Our group is developing a method for tertiary treatment of waters, that is removal of inorganic nutrients such as nitrate, ammonium or phosphate, through the controlled growth of the filamentous alga *Hydrodictyon reticulatum*. This alga is cultured in situ in a channel built in the experimental farm "La Higuera", not far from Madrid. *Hydrodictyon* grows inside Nylon bags that allow the passage of light and water. This way, the treated water can be used directly for agricultural purposes or, after sterilization, even human or industrial ones. The algae, by using the nutrients dissolved in the water, produce biomass that may be used later for fertilization or production of plant protein-rich feed. Further treatment of the biomass may lead to the production of pigments (such as asthaxanthin or carotenes) of high commercial value.

creciente, que contamina cada vez más y que pretende mejorar su calidad de vida. Aparte de una inversión en las infraestructuras de ingeniería que conduzca a la mejor utilización del agua, se requiere el desarrollo de sistemas innovadores que permitan la reutilización del agua tras su paso por los núcleos urbanos o por las áreas agrícolas y ganaderas.

El agua "reciclada" debe estar libre de sólidos en suspensión, materia orgánica y nutrientes minerales. Los sistemas de depuración más utilizados en la actualidad para el tratamiento de aguas residuales urbanas sólo son capaces de eliminar los sólidos en suspensión y la mayor parte de la materia orgánica, mientras que se muestran muy poco eficientes en la eliminación de los iones de N, P y S, nutrientes básicos para los organismos vegetales. Por lo tanto, estos compuestos minerales son vertidos a los ríos en grandes cantidades, a las que hay que sumar el aporte por escorrentía en las áreas ganaderas y agrícolas. Cuando esta agua rica en nutrientes llega a los pantanos, lagos o demás humedales, se produce el fenómeno de eutrofización, que conlleva la proliferación descontrolada de algas y, posteriormente, la descomposición bacteriana de toda esa materia orgánica, con lo que el agua previamente depurada vuelve a presentar unas características que la inhabilitan para su utilización y que perjudican a los ecosistemas lacustres y marinos.

Nuestro grupo trabaja en el desarrollo de un método de tratamiento terciario de las aguas, esto es, la eliminación de los nutrientes inorgánicos más importantes para las algas (nitrato, amonio, fosfato) mediante el crecimiento controlado de algas filamentosas de la especie *Hydrodictyon reticulatum*. El cultivo de este alga se realiza *in situ* en un canal construido en un arroyo a su paso por la finca experimental "La Higuera", en la provincia de Toledo. Las algas crecen en el interior de unas bolsas transparentes de Nylon, que permiten el paso del agua a tratar pero impiden el de las algas. De esta manera, el agua tratada se puede utilizar directamente para usos agrícolas (regadío, ganado) o se puede esterilizar posteriormente para diversos usos domésticos o industriales. La recolección de las algas se realiza fácilmente, y esta acción es indispensable en el proceso, dado que es en ese momento cuando se retiran los compuestos de N, P y S incorporados por las algas. Se obtiene así una biomasa cuyo empleo como fertilizante natural puede servir como alternativa al de los fertilizantes de síntesis química. La utiliza-

ción de esta biomasa, por otra parte, puede estar dedicada a la producción de piensos ricos en proteínas de origen vegetal, de tanta transcendencia hoy en día, o al cultivo de invertebrados herbívoros de gran valor en acuicultura como alimento para peces. Sin embargo, una utilización más ambiciosa puede incluir la comercialización de diferentes pigmentos (astaxantina, carotenos, etc.), de alto valor económico.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PB96-0554-COI (1996-1999)
- DGICYT, PB98-1022-CO2-02 (1999-2002)
- CAM, 07M/0045/1999 (2000-2000)

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

- Quiñones, M.A., Galván, A., Fernández, E., and Aparicio, P.J. (1999). Blue-light requirement for the biosynthesis of an NO₂- transport system in the *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate transport mutant S10 *Plant Cell Environ.* 22, 1169-1175
- Witt, F.G., Stöhr, C., and Ullrich, W.R. (1999). Soluble and membrane-associated nitrate reductases in the dinoflagellate *Peridinium gatunense*. *New Phytol.* 142, 27-34.
- Giráldez, N., Aparicio, P.J., and Quiñones, M.A. (2000). Limiting CO₂ levels induce a blue light-dependent HCO₃⁻ uptake system *Monoraphidium braunii*. *J. Exp. Bot.* 51, 807-815.
- Lu, Z., Quiñones, M.A., and Zeiger, E. (2000). The temperature dependence of guard cell respiration and stomatal conductance co-segregate in an F2 population of Pima cotton *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 457-462.

Interacciones Macromoleculares *Macromolecular Interactions*

GERMÁN RIVAS CABALLERO

Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

ALLEN P. MINTON (VI-VIII, 2000)

Investigador Visitante / *Visiting Scientist*

ANDREW KRALICEK (Desde VI-1999)

B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

JAVIER FERNÁNDEZ MARTÍNEZ (Hasta II-2000)

JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ IZQUIERDO (Desde VI-2000)

MARTA LAGES GONZALO (Hasta IX-1999)

ASUNCIÓN LÓPEZ FERNÁNDEZ (Hasta IX-1999)

B. Predoctorales/ *Graduate Students*

MERCEDES JIMÉNEZ SARMIENTO (Desde I-2000)

Personal Técnico / *Technician*

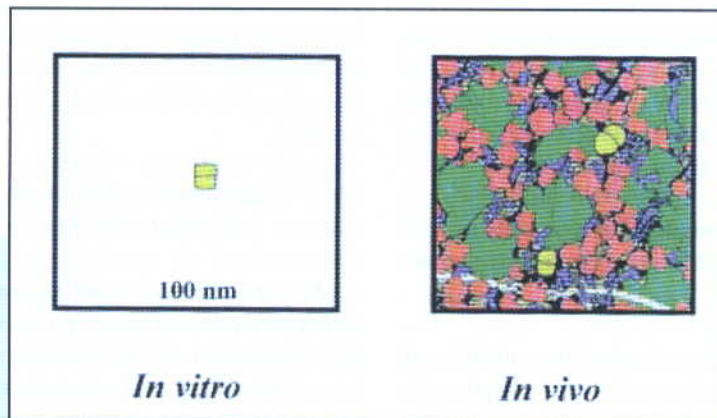


Figura 1: Tomada de R.J. Ellis & E.U. Hartl (1996) FASEB J. 10:20-26, con permiso de los autores. Esta figura ilustra la diferencia entre las disoluciones ideales en las que habitualmente se estudian las propiedades de macromoléculas aisladas (*In vitro*: la imagen amarilla representa una molécula de la chaperona GroEL en una disolución diluida a una concentración típica de los estudios que se realizan para conocer sus propiedades moleculares) y el ambiente intracelular de aglomeración macromolecular en el que han evolucionado para ejercer su función (*In vivo*: las imágenes amarillas representan dos moléculas de GroEL dentro del mismo volumen del aglomerado citoplasma bacteriano donde GroEL se encuentra normalmente).

Figure 1: Taken from R.J. Ellis & E.U. Hartl (1996) FASEB J. 10:20-26, with permission from the authors. This figure illustrates the difference between the uncrowded buffers in which properties of purified macromolecules are commonly studied (*In vitro*: the yellow image represents a molecule of the molecular chaperone GroEL in an uncrowded buffer at the concentration normally used to study its properties in isolation) and the crowded intracellular environment in which they have evolved to function (*In vivo*: the yellow images represent two molecules of GroEL inside the same volume of crowded bacterial cytoplasm where GroEL normally occurs).

Palabras clave: Ciencia de proteínas, Bioquímica física, Biología estructural, Centrifugación analítica, División celular bacteriana, FtsZ, Aglomeración macromolecular

Muchas de las reacciones bioquímicas en un sistema biológico se llevan a cabo o están facilitadas por ensamblajes o complejos macromoleculares dinámicos cuya función depende de interacciones reversibles, que regulan la actividad bioquímica del complejo o promueven modificaciones estructurales ligadas a función. Para entender en profundidad la relevancia fisiológica de estos complejos *in vivo* es necesario conocer cómo afectan a su estructura y función factores del ambiente intra y extracelular. Entre estos factores ha de considerarse la aglomeración macromolecular, consecuencia de la elevada concentración total de macromoléculas (y la consiguiente alta ocupación de volumen) de la mayoría de los sistemas biológicos (Fig. 1). Nuestro laboratorio se centra en entender la influencia de la aglomeración macromolecular sobre la energética y la dinámica de procesos de asociación de proteínas con interés farmacológico. En la actualidad estudiamos la proteína de división celular bacteriana FtsZ y proteínas del plasma sanguíneo implicadas en procesos vasculares (fibrinógeno). Aplicamos métodos de bioquímica y biofísica de proteínas y de caracterización de interacciones ligando-receptor, con énfasis en centrifugación analítica.

Efecto de la aglomeración macromolecular sobre las asociaciones funcionales de proteínas. Métodos de centrifugación analítica

Hemos desarrollado y aplicado métodos de equilibrio de sedimentación con componentes marcados que permiten la medida de la actividad química y de las asociaciones funcionales de proteínas individuales en presencia de concentraciones arbitrariamente altas de otros componentes macromoleculares, medio que se asemeja a las condiciones fisiológicas de aglomeración macromolecular (proyecto con el grupo del Dr. Allen Minton, NIH, Bethesda, USA). En paralelo, hemos colaborado con el grupo de la Dra. Pilar Lillo (Inst. Quím. Fis., CSIC, Madrid) en la aplicación de métodos de espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo para la caracterización de propiedades conformacionales y dinámicas de proteínas en condiciones de aglomeración macromolecular.

Keywords: Protein science, Physical biochemistry, Structural biology, Analytical centrifugation, Bacterial cell division, Analytical centrifugation, FtsZ, Macromolecular crowding

Many of the biochemical reactions in a biological system are either carried out or facilitated by dynamic macromolecular assemblies or complexes the function of which depend upon reversible interactions, either to regulate the biochemical activity of the complex or to promote function-linked structural modifications. In order to fully understand the physiological relevance of these complexes in vivo it is necessary to know how intra and extracellular environmental factors affect their structure and function. Among these factors it has to be considered macromolecular crowding, which is a consequence of the high total concentration of macromolecules (and hence, the high volume occupancy) of most biological systems (Fig. 1). Our laboratory is focussed in understanding the role of macromolecular crowding on the energetics and dynamics of protein associations with pharmacological interest. Actually we study the bacterial cell division protein FtsZ, and blood plasma proteins involved in vascular processes (fibrinogen). We apply methods of protein biochemistry and biophysics, as well as methods for the characterization of ligand-receptor interactions, with emphasis on analytical centrifugation.

Effect of macromolecular crowding on functional protein associations. Analytical centrifugation methods

We have developed and applied tracer sedimentation equilibrium methods to measure the chemical activity and the functional associations of individual proteins in the presence of arbitrary high concentrations of other macromolecular components, resembling the crowded physiological media (project with the group of Dr. Allen Minton, NIH, Bethesda, USA). In parallel, we have collaborated with the group of Dr. Pilar Lillo (Inst. Quím. Fis., CSIC, Madrid) in the application of time resolved fluorescence spectroscopy methods to characterize the conformational and dynamic properties of proteins in such crowded media. Finally, we have collaborated with the group of Dr. Ramón Díaz-Orejas (CIB-CSIC) on the molecular characterization of protein-protein and protein-DNA associations in bacterial replication systems by means of analytical centrifugation.

Por último, hemos colaborado con el grupo del Dr. Ramón Díaz-Orejas (CIB-CSIC) en la caracterización molecular de asociaciones proteína-proteína y proteína-DNA de sistemas de replicación bacterianos mediante métodos de centrifugación analítica.

Interacciones funcionales de la proteína de división celular bacteriana FtsZ

Hemos caracterizado, mediante métodos de equilibrio y velocidad de sedimentación, las propiedades de asociación de FtsZ, proteína mayoritaria del anillo de septación de *E. coli* que es esencial para la división de la bacteria. Hemos observado que el monómero de FtsZ forma oligómeros lineales mediante un proceso de asociación reversible, no cooperativo y que está ligado a la unión del catión magnesio (proyecto en asociación con los grupos de los Drs. José M. Andreu, CIB-CSIC, y Miguel Vicente, CNB-CSIC). Muy recientemente, hemos demostrado que la exclusión de volumen debida a condiciones de aglomeración macromolecular semejantes a las fisiológicas facilita la oligomerización de FtsZ (Rivas et al. (2001) PNAS-USA 98:3150-3155; proyecto en colaboración con el Dr. Allen Minton, NIH).

Interacciones funcionales de proteínas vasculares del plasma sanguíneo

Hemos caracterizado las propiedades de exclusión de volumen de un medio que se asemeja al plasma sanguíneo, que incluye la apropiada concentración de pequeños ligandos y de los componentes macromoleculares mayoritarios (albúmina y globulinas) presentes en el plasma, mediante la aplicación de los métodos de centrifugación analítica desarrollados en el laboratorio. Esta etapa ha sido un requisito previo para poder caracterizar en este medio el comportamiento de proteínas implicadas en los procesos de coagulación y hemostasia, lo que constituye una extensión de nuestro estudio previo sobre el efecto de altas concentraciones de albúmina sobre las propiedades conformacionales y de asociación de fibrinógeno.

Functional interactions of the bacterial cell division protein FtsZ

We have characterized the concentration-dependent behavior of FtsZ, a major protein component of the septation ring in E.coli which is essential for cell division, by means of sedimentation equilibrium and velocity. We have observed that FtsZ monomer undergoes a reversible non-cooperative Mg⁺⁺-linked association to form linear oligomers of indefinite length (project in association with the groups of Drs. José M. Andreu, CIB-CSIC, and Miguel Vicente, CNB-CSIC). Very recently, we have provided a direct evidence that pure volume exclusion can enhance the self-assembly of FtsZ in macromolecularly crowded solutions (Rivas et al., (2001) PNAS-USA 98:3150-3155; project in collaboration with Dr. Allen Minton, NIH).

Functional interactions of vascular proteins from blood plasma

We have characterized the excluded volume properties of a medium that resembles blood plasma, which includes small molecule constituents in appropriate concentration and the major macromolecular constituents of plasma (namely albumin and globulins) by means of analytical centrifugation methods developed in our laboratory. This is a required step to further characterize the behavior of proteins involved in coagulation and hemostasis, which is an extension of our previous study on the effect of high concentration of albumin on the conformational and association properties of fibrinogen.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MEC, Proyectos PB95-0120 (1996-1999)
- CAM, 07B/0042/1999 (1999-2000)
- MCT, BIO99-0859-C03-03 (1999-2002)
- CAM, Programa de Grupos Estratégicos (2000-2003)

Publicaciones/Publications**Artículos en Revistas/Journal Articles**

- De los Ríos, V., Mancheño, J. M., Martínez del Pozo, A., Alfonso, C., Rivas, G., Oñaderra, M., Gavilanes, J. G. (1999). Sticholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*, is a monomer-tetramer associating protein. *FEBS Lett.* **455**, 27-30.
- Rivas, G., Fernández, J., Minton, A.P. (1999). Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium: theory, experiment, and biological significance. *Biochemistry* **38**, 9379-9388.
- Rivas, G., Stafford, W., Minton, A.P. (1999). Characterization of heterologous protein-protein interactions via analytical ultracentrifugation. *Methods* **19**, 194-212.
- Murza, R., Sánchez-Cortés, S., García-Ramos, J.V., Guisan, J.M., Alfonso, C., Rivas, G. (2000). Interaction of the antitumor drug 9-aminoacridine with guanidino-benzoate studied by spectroscopic methods: a possible tumor marker probe based on the fluorescence exciplex emission. *Biochemistry* **39**, 10557-10565.
- Rivas, G., López, A., Mingorance, J., Minton, A.P., Ferrándiz, M.J., Vicente, M., Zorrilla, S., Andreu, J. M. (2000). Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer: The primary steps of FtsZ assembly. *J. Biol. Chem.* **275**, 11740-11749.

Departamento de Fisiopatología y Genética Molecular Humana
Department of Physiopathology and Human Molecular Genetics

Jefe de Departamento
Department Head

RAMÓN B. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Profesor de Investigación

ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ

Investigadores Científicos

JOSÉ ANTONIO ABRISQUETA ZARRABE
ANTONIO MARTÍN GONZÁLEZ
CARLOS RODRÍGUEZ MURCIA

Científicos Titulares

ÁNGELA CASADO MORAGÓN
OFELIA GARCÍA HERMIDA
CONSUELO GONZÁLEZ MANCHÓN
GONZALO GÓMEZ ALARCÓN
MARÍA A. JAREÑO CAÑADA
ÁNGELES MARTÍN REQUERO
RAMÓN B. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Personal Técnico

MARÍA JOSÉ ARIAS-SALGADO ROSBY
M^a AMPARO CERRAJERO HERNÁNDEZ
TOMÁS FONTELA CASADO
M^a ENCARNACIÓN LÓPEZ FERNÁNDEZ
JUANA M^a LORENZO VIÁN
M^a CARMEN PÉREZ LAMIGUEIRO
M^a JOSÉ TOBAJAS MARTÍN

Secretaria

OLVIDO PARTEARROYO LACASA

Fijación Directa del N₂ Direct N₂ Fixation

ANTONIO MARTÍN GONZÁLEZ
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

M^a JOSÉ TOBAJAS MARTÍN
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Fijación de N₂, *Azotobacter*, *Azospirillum*, biofertilizantes, factores de crecimiento

Keywords: N₂ fixation, *Azotobacter*, *Azospirillum*, biofertilizers, growth agents

Estudiamos los factores de crecimiento y la fijación de N₂ por mutantes específicos de *Azotobacter* y *Azospirillum* con mayor actividad biológica para su empleo como biofertilizantes.

*We are studying growth agents and the N₂ fixation by specific mutants of *Azotobacter* and *Azospirillum* with a higher activity in order to use them as biofertilizers.*

Igualmente obtenemos alginatos por medio de mutantes específicos de *Azotobacter vinelandii*.

*We are also obtaining alginates by means of specific mutants of *Azotobacter vinelandii*.*

Explotación y desarrollo de la Patente "Fertilizante bacteriano y procedimiento de obtención". (Nº 9500851. Empresa C.S.I.C.), financiada por la Comisión Europea a través de un Proyecto LIFE de la Dirección General del Medio Ambiente, Seguridad Nuclear y Protección Civil en Bruselas.

Development and tapping of the patent "Bacterial fertilizer and obtention procedure" (Nº 9500851, Company – CSIC) granted by the European Commission through "LIFE Project" of the "Dirección General de Medio Ambiente, Seguridad Nuclear y Protección Civil", in Bruselas.

Los objetivos fundamentales de esta planta son, entre otros, la producción de biofertilizantes fijadores de N₂ y la biosíntesis de factores de crecimiento. Inicialmente, su producción se ha destinado a realizar pruebas en campo con diferentes cultivos, siendo los resultados muy favorables.

Production of Nitrogen fixing biofertilizers and biosynthesis of plant growth promoters are the main goals of this plant. The production, at the starting point, has been employed in several field trials, yielding very encouraging results.

Organismos financiadores/Funding Agencies

— Contrato CIB/Catalysis, S.L. (1999)

Patentes/Patents

— Continúa el desarrollo y explotación de la patente "Fertilizante bacteriano y procedimiento de obtención". Empresa-CSIC, financiada por la CE, y la comercialización de los biofertilizantes. 9500851 (España).

Genética Humana Human Genetics

JOSÉ ANTONIO ABRISQUETA ZARRABE

Jefe de Grupo / Group Leader

CARLOS RODRÍGUEZ MURCIA

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

VITALINO ALLER RACINO

MARÍA ÁNGELES MARTÍN LUCAS

JUAN MENATA FERNÁNDEZ

Investigadores Jóvenes / Young Scientists

M^a ANTONIA FERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

M^a CARMEN PINO LAMIGUEIRO

Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Embrión humano, genética del desarrollo, clonación, bioética

Keywords: Human embryo, developmental genetics, cloning, bioethics

Cuestiones éticas relacionadas con la genética del desarrollo embrionario humano

Ethical questions related to the genetic development of human embryo

El tema del embrión humano, en sus fases iniciales de desarrollo, ha experimentado estos últimos años un cambio espectacular, tanto en su planteamiento como en sus consecuencias, con motivo de toda la problemática suscitada por el hecho de la clonación obtenida en la oveja Dolly (1997) y su posible aplicación al hombre.

The issue of human embryo, particularly at its earliest developmental stages, has recently experienced spectacular changes, due to the varied approaches as well as the conclusions drawn from the different points of view. This may be partially because of the problems raised by the successful cloning of Dolly the sheep (1997) and the foreseeable future application to human cloning.

De acuerdo con esta nueva situación, hemos tenido oportunidad de analizar los dilemas éticos que la clonación y en consecuencia la situación del embrión presentaba. El estudio se ha ajustado a la nueva problemática surgida entre el embrión "natural", formado por una fecundación normal, y el embrión "artificial" obtenido por una transferencia nuclear de un núcleo de la célula adulta, que ha sido reprogramado, a un ovocito enucleado

Within that new frame, we have taken the opportunity of analyzing the ethical dilemmas and thus the real status of human embryo. In order to develop our approach on the new issues raised, our study was rearranged according to the present knowledge. That meant we had to consider both, the "natural" embryo formed by normal fertilization and the "artificial" embryo obtained by nuclear transferring of an adult cell nucleus, which has been reprogrammed, to an enucleated oocyte.

Investigación genética del síndrome de Down

Se trata de un Proyecto Colaborativo de Investigación que se lleva a cabo en nuestro Laboratorio de Genética Humana, con la participación del Laboratorio de la Dra. Angela Casado y la colaboración de la Unidad de Pediatría Social del Hospital del Niño Jesús y el Servicio de Pediatría del Hospital de San Rafael.

Esta investigación se propone profundizar en el conocimiento del cromosoma 21 y en los mecanismos que ocasiona su presencia por triplicado en los individuos con síndrome de Down. El proyecto se diseña con el intento de aportar nuevos datos al estado actual de conocimientos sobre la correlación fenotipo-genotipo, asociando los rasgos clínicos característicos del síndrome con las alteraciones genéticas reveladas por el análisis citogenético y molecular, contribuyendo a la construcción del mapa fenotípico del síndrome.

Al estudio se añade el análisis de varios marcadores bioquímicos SOD, CAT y MDA, de interés en la dinámica patológica del síndrome.

Genetic research on Down syndrome

This project, established as a collaborative research work, is being carried out in our laboratory of Human Genetics, the laboratory of Dr. Angela Casado, the Unity of Social Pediatrics (Hospital del Niño Jesús-Madrid) and the Pediatrics Service (Hospital de San Rafael-Madrid).

Our research is aimed to seek a deeper knowledge of chromosome 21 and the mechanisms which trigger off the triple presence of that chromosome as observed in most patients affected by Down syndrome. The purpose of our project is to contribute with new information to the current knowledge on the phenotype-genotype correlations by associating the clinical traits of the syndrome with the genetic anomalies showed by the cytogenetic and molecular analysis. Thus, to contribute to complete the phenotypic Down syndrome map.

In addition to the above studies, we are determining several biochemical markers, such as SOD, CAT and MDA which are of interest in the dynamics of the syndrome's pathology.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- Fundación Ramón Areces (1999-2000)
- Fundación Inocente-Inocente y la colaboración de la Fundación Síndrome de Down de Madrid (2000-2003)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Abrisqueta, J.A. (1999). Consejo Genético. Puericultura hoy. 1, 13-15.
- Abrisqueta, J.A. (1999). Genes y Discriminación. Revista de Derecho y Genoma Humano. 11, 155-166.
- Abrisqueta, J.A. (1999). Investigación genética del síndrome de Down. Madrigal: Revista de la Fundación Síndrome de Down, 10.
- Abrisqueta, J.A. (1999). El libro de la vida. El Semanal. 635, 92.
- Abrisqueta, J.A. (1999). Perspectivas actuales de la Genética Humana. Ponencia de la X Reunión interdisciplinaria sobre poblaciones de alto riesgo de Deficiencias. Madrid. Ministerio de Sanidad y Consumo. Internet: <http://www.paidos.rediris.es/genysi> número 1.
- Abrisqueta, J.A. (1999). Proyecto Genoma Humano. Internet: <http://www.tusalud.com>, número 3.
- Abrisqueta, J.A. (1999). Abrisqueta, J.A. (2000). Tests Genéticos. Internet: <http://www.tusalud.com>, número 3.
- Abrisqueta, J.A. (2000). El horizonte biológico del envejecimiento humano. Verdad y Vida. 227, 135-142.
- Abrisqueta, J.A. (2000). De la oveja Dolly a las "células madre". Verdad y Vida. 228, 355-368.
- Abrisqueta, J.A. (2000). Sobre clones y células madre. Newton. 30, 3.
- Abrisqueta, J.A. (2000). El mapa de la vida. Los domingos de ABC. número 23.

Marcadores Tumorales y Procesos de Envejecimiento

Tumoral Markers and Aging Processes

ÁNGELA CASADO MORAGÓN
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigadora de Carrera / *Staff Scientist*

M^a ENCARNACIÓN LÓPEZ FERNÁNDEZ
Personal Técnico / *Technician*

ROCÍO RUÍZ SÁNCHEZ (Desde XII-2000)
B. Predoctoral / *Graduate Student*

Palabras clave: Alfa fetoproteína (AFP), valor diagnóstico, prevención, radicales libres, envejecimiento, SOD, CAT, MDA, GPx, GR

Keywords: Alpha-fetoprotein (AFP), diagnostic value, prevention, free radicals, aging, SOD, CAT, MDA, GPx, GR

Utilización de Alfa fetoproteína (AFP) como marcador de procesos tumorales

Alpha-fetoprotein as a tumoral marker

Alfa- fetoproteína (AFP) es la mayor proteína plasmática embrionaria de vertebrados, incluyendo al hombre. Es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 70.000 Daltons. El gen para AFP humana está localizado en el cromosoma 4. La determinación de AFP se ha utilizado como marcador tumoral de determinados tipos de neoplasias (carcinomas de hígado y tumores germinales de testículo), y constituye un factor de pronóstico importante. Sin embargo, se ha descrito la presencia de AFP en pacientes con cáncer de mama, de pulmón, y otros tipos de neoplasias. Los objetivos de este trabajo se centran en la valoración sérica de AFP para determinar, en primer lugar, el diagnóstico de extensión de procesos cancerosos histológicamente diversos analizando su valor pronóstico y, en segundo lugar, estudiar la evolución de los niveles de AFP tanto en pacientes sin tratamiento previo, como en pacientes con tratamiento, para estudiar en ambos casos la respuesta al tratamiento instaurado.

Alpha-fetoprotein (AFP) is the major plasma protein of vertebrate embryos including man. AFP is a glycoprotein with a molecular weight of about 70,000 Da. The human AFP gene is located on chromosome 4. Serum AFP has been confirmed as a reliable tumor marker in certain types of neoplasm (hepatocellular carcinoma and testicular germ cell tumors), and might be a useful tumor marker in evaluating the prognoses of patients. However, it reported the presence of AFP in patients with breast cancer, lung cancer and other types of neoplasm. The objectives of this work are to measure serum AFP levels evaluating its value as a marker for various tumors and provide us with valuable information about stages and/or prognoses, and in the second place, to analyze the change of secretion of AFP in patients not having been treated and in patients requiring additional therapy to evaluate in both, the response to the treatment administered.

Radicales libres y envejecimiento

Los radicales libres de oxígeno (RLO) formados durante el metabolismo celular han sido reiteradamente implicados en el proceso general de envejecimiento. Las reducciones univalentes del oxígeno por las células aeróbicas generan RLO como el anión superóxido y el radical hidroxilo. Estas especies, altamente reactivas, provocan una cadena de lesiones en el interior celular, afectando entre otras biomoléculas a las proteínas, al DNA y a los lípidos. Los RLO se generan en los tejidos como consecuencia de diversas actividades metabólicas, entre las que cabe destacar algunas vías principales, como el sistema enzimático de la xantina oxidasa/dehidrogenasa, la autooxidación de las catecolaminas, la oxidación de grupos hemo, el metabolismo del ácido araquidónico, y por la alteración en la cadena de transporte mitocondrial. Se ha postulado que existe un equilibrio dinámico entre la generación de RLO y la actividad de los sistemas de defensa antioxidante. Estos sistemas actúan como un elemento de regulación con una notable expresión génica. Los antioxidantes protegen a las estructuras celulares de la acción nociva de los agentes oxidantes, por lo que se ha considerado su implicación en el proceso de envejecimiento. Se ha observado que la expectativa de vida máxima para diferentes cohortes de población se correlacionaba positivamente con la actividad de las defensas antioxidantes, y negativamente con la producción de RLO. A pesar de la existencia de defensas antioxidantes, una fracción variable de radicales libres escapan a los sistemas de eliminación y generan daño estructural. La peroxidación lipídica es una importante consecuencia biológica de la acción de los RLO sobre los fosfolípidos de membrana. Los RLO ejercen gran parte de sus efectos citotóxicos a través de este mecanismo, produciendo cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, aumento de su fluidez, mayor rigidez, y en última instancia, pérdida de la integridad de las mismas. El malondialdehído (MDA) es uno de los productos de bajo peso molecular resultante de la fragmentación que sufren los ácidos grasos poliinsaturados por la agresión de los RLO. Niveles elevados de MDA son indicativos de un alto estrés oxidativo. Los objetivos de este trabajo se centran en la determinación de dos enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y en la valoración de MDA. Estas determinaciones se realizan en pacientes con desordenes de envejecimiento y en profesionales que soportan elevados niveles de estrés.

Free radical and aging

Oxygen free radical (OFRs) generated during the cellular metabolism have been involved in the aging process. Univalent reductions of oxygen by aerobic cells generated OFRs like superoxide anion and hydroxyl radical. OFRs are unstable compounds which exert toxic effects by reacting with lipids, proteins and nucleotides to produce oxidized compounds. OFRs are generated in the tissues as a consequence of several metabolic activities such as enzymatic system of xantine oxidase/dehydrogenase, autoxidation of catecholamines, oxidation heme groups, metabolism arachidonic acid and alteration in mitochondrial electronic transport chain. It have been postulated that a dynamic equilibrium exists between the generation of OFRs and the level of antioxidant defences, which acts as a set point for regulation of gene expression. Antioxidants protect biological system from oxidants and have been considered to act delaying aging. Longer life expectancy within cohort population is positively correlated to antioxidant defences and negatively to OFRs production. Despite the existence of antioxidant defenses, a fraction of free radicals escape elimination and cause structural damage. Lipid peroxidation is an important biological consequence of oxidative cellular damage. OFRs have been suggested to exert their cytotoxic effect by peroxidation of membrane phospholipids, changing the permeability of cellular membrane, increasing their fluidity, their rigidity and in some cases making them lose their integrity and increasing the risk of membrane rupture. An essential result of lipid peroxidation is that polyunsaturated fatty acids are decomposed by direct or indirect peroxidation processes that contain malondialdehyde (MDA) as an end product. MDA is the most abundant individual aldehyde resulting from lipid peroxidation. In this way, elevated levels of MDA are indicative of a high oxidative stress. This work is focussed on determination of two antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and evaluation of MDA, marker of lipid peroxidation. These determinations are made in patients with aging disorders and in professionals that bear high levels of stress

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- FIS, 0166 (1997-1999)
- Fundación Yébenes-Velo, (1998-1999)
- INRCA, (1996-1999)
- Fundación Rodríguez Pascual, (2000-2002)
- Fundación Inocente, Inocente, (2000-2003)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, ME., De la Torre, R., and Venarucci, D. (1999). Alpha fetoprotein (AFP) levels in patients with breast cancer. *Eur. J. Oncol.* 4 (1), 27-30.
- De la Torre, R., Casado, A., López-Fernández, ME., Carrascosa, D., and Venarucci, D. (1999). Superoxide dismutase activity levels in a Spanish population 50-93 years. *Amer. J. Hum. Biol.* 11, 45-47.
- Gil, P., Fariñas, F., Casado, A. y López-Fernández ME. (1999). Malonildialdehído: un posible marcador del envejecimiento. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 34, 75-77.
- Venarucci, D., Venarucci, V., Vallese, A., Battilá, Casado, A., De la Torre, R., and López-Fernández, ME. (1999). Free radicals: important cause of pathologies refer to ageing. *Panminerva Med.* 41, 335-339.

Contribuciones a libros/Contributions to books

- Casado, A., De la Torre, R., López-Fernández, M.E., Carrascosa, D., and Venarucci, D. (2000). Niveles de superóxido dismutasa (SOD) en la población española. En: *Investigaciones en Biodiversidad Humana*. Tito A. Varela, ed. (Ed. Universidad Santiago de Compostela) pp. 700-705.
-

Metabolismo y Patología Molecular *Metabolism and Molecular Pathology*

ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ

Jefe de Grupo / *Group Leader*

OFELIA GARCÍA HERMIDA

CONSUELO GONZÁLEZ MANCHÓN (Desde IV-1999)

ASUNCIÓN JAREÑO CAÑADA (HASTA VIII-2000)

ANGELES MARTÍN REQUERO

RAMÓN B. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

NORA VIVIANA BUTTA

ELENA URCELAY GARCÍA

Investigadoras Contratadas / *Research Associates*

SUSANA LARRUCEA BILBAO

B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

ELENA GARCÍA ARIAS-SALGADO

NATIVIDAD DE LAS CUEVAS MORENO (Desde IX-2000)

LIN-NAN-SEN (Desde I-1999)

JIANMING TAO (Hasta III-2000)

B. Predoctorales / *Graduate Students*

MARÍA JOSÉ ARIAS-SALGADO ROSBY

TOMÁS FONTELA CASADO

Personal Técnico / *Technician*



Palabras clave: Enfermedades genéticas, plaquetas, hemostasia, regulación transcripcional, enfermedad de Alzheimer

Keywords: Genetic diseases, platelets, haemostasis, gene transcription, Alzheimer disease

Fisiopatología y genética molecular de trastornos hemostáticos

Pathophysiology and molecular genetics of haemostatic disorders

Los objetivos generales en este área son: 1) Caracterizar funcionalmente células obtenidas de pacientes con procesos patológicos de nuestro interés; 2) Desvelar las bases genético-moleculares de la etiopatogenia de procesos patológicos humanos y establecer experimentalmente una correlación precisa entre cambios estructurales y funcionales. Para ello, se ha procedido a la clonación de genes mutantes potencialmente responsables de alteraciones funcionales, y a su expresión en sistemas heterólogos con el fin de analizar la capacidad funcional de las proteínas mutadas.

Succintly, the research on this area aimed at: 1) functional characterization of cells obtained from patients suffering of pathological processes of interest; 2) to disclose the existence of genetic structural changes associated with human pathology and to determine the relationship between the structural changes and the functional perturbations. For this purpose, we have cloned mutant genes involved in pathological processes and studied their functional properties. The latter has been achieved by either analyzing the translational products of these genes expressed in heterologous systems or transfecting constructions of the mutant genes into the appropriate strain of cultured cells.

Se presta atención preferente a:

a) El estudio de las bases genético-moleculares de los trastornos hemostáticos, en particular tromboastenias y síndromes macrotrombocitopénicos.

b) Los mecanismos de activación plaquetaria. Este estudio comprende:

La manipulación genética del receptor de fibrinógeno (Fg) humano y su expresión estable en líneas celulares establecidas para su caracterización funcional.

Coexpresión del receptor de Fg y receptores de agonistas fisiológicos.

Caracterización de las vías de señalización responsables del incremento de adherencia celular y de la agregación de células en suspensión mediados por agonistas fisiológicos.

Clonación, caracterización estructural y funcional de genes humanos regulables por T3

El objetivo general de esta línea de trabajo es elucidar los mecanismos moleculares implicados en el control de la actividad de enzimas humanos regulados por hormonas tiroideas. Con objeto de determinar si la actividad de estas proteínas está regulada a nivel de transcripción, hemos clonado la región 5' adyacente a la zonas codificadoras de los genes de la forma mitocondrial, FAD-dependiente, de la alfa-Glicerol fosfato deshidrogenasa, así como de las formas citosólica y mitocondrial del enzima Máfico y estudiado su organización estructural y funcional.

Papel de las alteraciones en los procesos de señalización y ciclo celular en la enfermedad de Alzheimer

Una de las características de la enfermedad de Alzheimer es la degeneración neuronal irreversible en regiones del cerebro asociadas con las funciones cognitivas. Los mecanismos moleculares implicados en la muerte neuronal no son bien conocidos. El objetivo general de este proyecto se basa en la hipótesis de que alteraciones en los mecanismos de control de la homeostasis iónica y del ciclo celular pudieran estar asociados con la muerte neuronal. Estamos estudiando los mecanismos de control de la homeostasis iónica y del ciclo celular en células inmortalizadas (linfoblastos) de enfermos de Alzheimer y donantes controles de la misma edad. Nos basa-

Special attention has been paid to the following subjects:

a) *Elucidation of the genetic molecular basis of haemostatic disorders, particularly thrombasthenias and macrothrombocytopenic syndromes.*

b) *Mechanism(s) of platelet activation. This study comprises: Genetic engineering of the human fibrinogen (Fg) receptor and its stable expression in established cell lines.*

Coexpression of the human Fg receptor and receptors for known physiological agonists.

Characterization of signaling pathways responsible for the cell adherence or aggregating responses induced by physiological agonists.

Cloning and structural-functional characterization of human T3 responsive genes

This research aimed at elucidating the molecular mechanisms involved in controlling the activity of thyroid hormones regulated human enzymes. For this purpose, we have cloned the 5'-flanking regulatory region of human mitochondrial alpha-Glycerol phosphate dehydrogenase and cytosolic and mitochondrial Malic enzyme and the regulation of the transcriptional activity of these genes determined by several experimental approaches.

Role of alterations on the processes of signaling and cell cycle on the Alzheimer disease

A characteristic of the Alzheimer's dementia (AD) is a progressive neuronal loss in certain brain regions. The molecular mechanisms of neuronal death are not well understood. The main goal of this research is to study whether ionic homeostasis perturbations or cell cycle disturbances could be associated with neuronal loss. We are studying these mechanisms in transformed lymphocytes from AD patients and age matched control individuals. Based on previous observations from ours and other laboratories, we hypothesise that AD is a systemic disorder with more prominent neurological manifestations. Therefore, since the regulatory mechanisms of cell cycle are, more or less, ubiquitous, we believe that the knowledge of mechanisms implicated in the perturbation of normal cell cycle progression in non-neuronal cell lines, easily accessible in patients, could give important clues about the etiopathogeny of AD disease and could eventually pro-

mos en observaciones previas, nuestras y de otros laboratorios, que indican que procesos patológicos del sistema nervioso pueden tener manifestaciones extraneurales cuya repercusión funcional podría pasar desapercibida. Este modelo experimental obvia las dificultades inherentes a la obtención de muestras del sistema nervioso. Sin embargo, dado que los mecanismos reguladores del ciclo celular son más o menos ubicuos, la importancia de validar este modelo experimental radica no sólo en avanzar en el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer, sino también en la posibilidad de desarrollar sistemas simples de diagnóstico precoz de la enfermedad. La detección de alteraciones en la actividad proliferativa de células extraneurales, podría facilitar el diagnóstico precoz de esta devastadora enfermedad.

vide a useful tool for the early diagnosis of this devastating disease.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- FIS, 96/2014 (1996-1999)
- CM, 08.4/003/1998 (1998-1999)
- DGICYT, PM97-0016 (1998-2001)
- DGICYT, PB97-1240 (1998-2001)
- AECI, 1999CN0009 (1999-2001)
- DGICYT, SAF 2000-012 (2000-2003)
- DGICYT, PM99-0095 (2000-2003)

Tesis doctorales /Doctoral Theses

(**Jianming Tao**. Bases genético-moleculares de la función plaquetaria. Universidad de Extremadura 1999. Directora: Consuelo González Manchón.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- D González-Manchón, C., Fernández-Pinel, M., Arias-Salgado, E.G., Ferrer, M., Álvarez, M.V., García-Muñoz, S., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (1999). Molecular genetic analysis of a compound heterozygote for the GPIIb gene associated with Glanzmann's thrombasthenia. Disruption of the 674-687 disulfide bridge in GPIIb prevents surface exposure of GPIIb-IIIa complexes. *Blood* 93, 866-875.
- González-Manchón, C., Sánchez-Ayuso, M., and Parrilla, R. (1999). AP-1 and T3RE cis elements operate as a functional unit in the transcriptional control of the human malic enzyme gene. *Gene* 226, 111-119.
- Tao, J., Arias-Salgado, E.G., González-Manchón, C., Díaz-Cremades, J., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2000). A novel (288delC) mutation in exon 2 of GPIIb associated with type I Glanzmann's thrombasthenia. *Br. J. Haematol* 111, 96-103.
- Tao, J., Arias-Salgado, E.G., González-Manchón, C., Iruín, G., Butta, N., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2000). A 1063G:A mutation in exon 12 of GPIIb associated with thrombasthenic phenotype. mutation analysis of [324E]GPIIb. *Br. J. Haematol.* 111, 965-973.
- Urcelay, E., Jareño, M.A., Menaya, J., Parrilla, R., Ayuso, M.S., and Martín-Requero, A. (2000). Cloning and functional characterization of the 5' regulatory region of the human mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene. lack of 3,5,3'-triiodothyronine responsiveness in adipose tissue. *Eur. J. Biochem.* 267, 7209-7217.

Microbiología Aplicada *Applied Microbiology*

GONZALO GÓMEZ ALARCÓN (HASTA XII-1999)
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

JUANA M^a LÓPEZ VILA (HASTA IX-2000)
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Bioalteración, microorganismos, materiales pétreos, biocidas

Los materiales que constituyen los monumentos, esculturas y otros objetos, al aire libre, se deterioran con el tiempo, debido a la acción agresiva de los contaminantes biológicos y antropogénicos que, inicialmente presentes en la atmósfera y en el suelo, terminan por adherirse y colonizar los sustratos pétreos. Para inhibir o retardar el deterioro, existen en el mercado diversos productos biocidas, hidrofugantes y consolidantes, que con frecuencia son aplicados, pero su eficacia, toxicidad e interacciones con los organismos no son suficientemente conocidos. Es necesario desarrollar nuevas líneas de trabajo encaminadas a esclarecer estos temas.

En primer lugar, los productos de protección deben ser ensayados en el laboratorio y más tarde en zonas reducidas del monumento para conocer las concentraciones más idóneas a utilizar. Debe estudiarse la correlación entre los resultados obtenidos sobre pequeñas muestras y en tratamientos *in situ*. Debe probarse la actividad de los compuestos sobre diferentes

Keywords: *biodeterioration, microorganisms, stone materials, biocides*

The materials that constitute monuments, sculptures, and other outdoor art objects, undergo weathering through the activity of biological and anthropogenic pollutants. Initially, these pollutants are present in the atmosphere and ground, but many of them adhere to and colonize stone substrates. Biocides, water-repellents and consolidants are usually used to inhibit or delay deterioration, but the effectiveness, toxicity and interactions with organisms are not sufficiently understood. New assays are necessary to resolve these questions.

The products for protection would first be assayed in the laboratory and afterwards in situ treatments to find the dose most suitable for use. The correlation between the results obtained with small samples treated in favourable laboratory conditions, and those with in situ treatments, should be studied. The activity of biocides and other compounds on different rock types, and in different environments should be tested. The interactions between biocides and stones must be understood. Several microbial strains

sustratos y en situaciones ambientales distintas. Debe conocerse la posible interacción física y química de los productos con el sustrato. Ensayos frente a un amplio espectro de organismos, a las dosis adecuadas, para estudiar interacciones, así como posibles problemas de toxicidad para los operadores y para el medio ambiente. Es preciso conocer si la combinación de biocidas e hidrofugantes es más eficaz y retarda la recolonización microbiana de los sustratos pétreos.

En el laboratorio se están aplicando diversas técnicas: microbiológicas, de microscopía de barrido y de láser confocal, de espectrometría de IR y de difracción de rayos X, entre otras, para conocer la actividad de diversos productos de protección frente a organismos autótrofos y heterótrofos, en ensayos de laboratorio y en el medio natural, con el fin de avanzar en la resolución de los temas anteriormente planteados.

should be tested to know the interactions, possible dangers for the applicator and environmental hazards. It is necessary to know which combination of biocides and water-repellents can be most effective to slow up microbial recolonization of the substrates. Our investigations have been directed, therefore, towards testing the activity of biocides and water-repellents on biodeteriorating autotrophic and heterotrophic microorganisms, both in the laboratory and on stone monuments themselves, with the goal of resolving these questions.

Departamento de Inmunología
Department of Immunology

Jefe de Departamento
Department Head

ANGELES GARCÍA PARDO

Profesor de Investigación

SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA

Investigadores Científicos

CARMELO BERNABEU QUIRANTE
ANGEL L. CORBÍ LÓPEZ
ANTONIO DE LA HERA MARTÍNEZ
ANGELES GARCÍA PARDO
JOSÉ MARÍA ROJO HERNÁNDEZ

Científicos Titulares

ISABEL BARASOAIN BLASCO
LUISA M^a BOTELLA CUBELLS
EDUARDO PÁEZ ABRIL
AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ
JOAQUÍN TEIXIDÓ CALVO

Personal Técnico

FRANCISCO GARCÍA TABARES
MERCEDES HERNÁNDEZ DEL CERRO
CARMEN LANGA POZA
JUANA MARÍA LÓPEZ VERA
BÁRBARA MORENO JIMÉNEZ
M^a LUISA DEL POZO DEL CAMPILLO
M^a SOLEDAD VARA DE REY

Secretaria

OLVIDO PARTEARROYO LACABA

Activación de Linfocitos T

T-lymphocyte Activation

JOSÉ MARÍA ROJO HERNÁNDEZ
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

M^a JOSÉ FEITO CASTELLANO
B. Predoctoral / Postdoctoral Fellow

GABRIEL CRIADO CARRASCO
ALEJANDRA SÁNCHEZ PÉREZ
B. Predoctorales / Graduate Students

M^a LUISA DEL POZO DEL CAMPILLO
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Linfocitos T, TCR/CD3, Crry/p65, CD46, ICOS

Mecanismos de variabilidad de las cadenas CD3 epsilon del complejo TCR/CD3 de linfocitos T

El complejo del receptor para antígeno de los linfocitos T (Complejo TCR/CD3) tiene una importancia central en el desarrollo de las respuestas inmunitarias frente a organismos patógenos y en la aparición de enfermedades autoinmunes. Por esta razón, el conocimiento de su estructura ha sido un objeto prioritario de estudio en el campo de la Inmunología. Todos los modelos actuales del complejo TCR/CD3 comparan la suposición de que las cadenas de los polipéptidos de CD3 son invariantes a nivel de la secuencia primaria, como lo son a nivel genético. Nuestro grupo ha detectado recientemente variabilidad en las cadenas de CD3 de dos maneras diferentes: primero, por las variaciones en la avidéz de un anticuerpo anti-CD3 (YCD3-1) frente al CD3 de distintas líneas T; y en segundo lugar por las diferencias en el reconocimiento de CD3 epsilon de distintas líneas por anticuerpos

Keywords: T Lymphocytes, TCR/CD3, Crry/p65, CD46, ICOS

Mechanisms of variability of CD3 epsilon chains of the TCR/CD3 complex of T lymphocytes

The antigen receptor complex of T lymphocytes (TCR/CD3 complex) is essential for the development of effective adaptive immune responses to a variety of pathogenic organisms, as well as for the generation of autoimmune diseases. Thus, the study of the structural features of TCR/CD3 is a prime target in Immunology. All current models of the TCR/CD3 complex assume that all CD3 polypeptide chains are invariant at the primary sequence level, as they are at the genetic level. Recently, our group has described that CD3 chains are variable, by two different criteria: Firstly, by differences in the avidity of one anti-CD3 monoclonal antibody (YCD3-1) towards the CD3 complex in different T cells and T cell lines. Secondly, by the differences in the recognition of the CD3 epsilon polypeptide from different T cells by anti-peptide antibodies raised against the amino-terminal sequence of mouse CD3 epsilon (see publications). These differences correlate with differences in the strenght of the interaction

específicos para la secuencia amino-terminal de CD3 epsilon de ratón (ver publicaciones). Estas diferencias se correlacionan con diferencias en la fuerza de la asociación TCR-CD3 y, posiblemente, con diferencias en la facilidad de ligandos del TCR para iniciar señales activadoras o el fenotipo Th1/Th2 y CD4⁺/CD8⁺ de las células T analizadas (datos no publicados).

Hemos podido desechar el "splicing" alternativo del RNAm de CD3 epsilon como mecanismo de generación de variabilidad amino-terminal de CD3 epsilon, que parece debida a distintos grados de degradación por metaloproteasas sensibles a fenantrolina. La existencia de un mecanismo de alteración de las propiedades del TCR/CD3 por proteasas permite una modulación farmacológica del mismo muy atractiva "a priori".

Actualmente nos proponemos confirmar un modelo de complejo TCR/CD3 en el que la accesibilidad de anticuerpos como YCD3-1 a su epítipo depende de la interacción CD3-TCR, que a su vez es regulada por el extremo amino-terminal de CD3 epsilon, dependiendo del número de cargas negativas que posea. Por tanto, nos proponemos determinar exactamente las metaloproteasas implicadas en la variabilidad de CD3 epsilon, la influencia de las variaciones de la secuencia en distintos aspectos de la estructura del complejo TCR/CD3 y en las señales activadoras del mismo, y, por último, establecer la existencia de fenómenos de variabilidad similares en la cadena CD3 epsilon humana.

ICOS, una nueva molécula coestimuladora de la familia de CD28

La activación óptima de las funciones efectoras de los linfocitos T y la expansión clonal de células antígeno-específicas requiere dos señales: La primera librada por el receptor para antígeno, y la segunda, por moléculas coestimuladoras. Parece razonable asumir que la existencia de diferentes moléculas con función coestimuladora tiene como origen la necesidad del Sistema Inmune de adaptarse a distintas exigencias en cuanto a la puesta en marcha de mecanismos efectores adecuados a distintos patógenos, y que hay vías celulares que son activadas preferentemente por distintas moléculas coestimuladoras. En 1996 describimos, en colaboración con el grupo del Dr. Umberto Dianzani (U. Amedeo Avogadro, Novara, Italia), una nueva molécula coestimuladora detectada en lin-

between the TCR and CD3 and, probably, with differences in the ability of TCR ligands to induce activation signals, or with the Th1/Th2 or CD4⁺/CD8⁺ phenotype of the T cells (unpublished results).

We have excluded alternative splicing of CD3 epsilon mRNA as the mechanism of variability for the amino-terminal region of CD3 epsilon. Rather, it seems to be due to different degrees of amino-terminal degradation by the action of phenantroline-sensitive metalloproteases. The changes of TCR/CD3 properties through the action of proteases might allow an attractive possibility of pharmacologic modulation of TCR activation.

We are currently trying to confirm a model of TCR/CD3 complex where the accessibility of anti-CD3 antibodies like YCD3-1 to their epitopes depends on the interactions between TCR and CD3, which is in turn regulated by the number of negatively charged amino acid residues remaining in the amino-terminal region of CD3 epsilon. Our aims are to precisely determine the metalloproteases implicated in the variability of CD3 epsilon chains, the influence of sequence variations in different aspects of TCR/CD3 complex structure and activation, or the existence of similar variability mechanisms in human TCR/CD3 complexes.

ICOS, a new costimulatory molecule of the CD28 family

Optimal activation of T lymphocyte effector functions, as well as the clonal expansion of antigen-specific T cells require two signals: The first one is delivered by the antigen receptor, while the second is delivered by costimulatory molecules. It is reasonable to assume that the existence of different costimulatory molecules is a consequence of the need that the Immune System has to adapt itself to the different demands of effector mechanisms adequate to cope with different kinds of pathogenic organisms, and, consequently, that different costimulatory molecules preferentially trigger certain cellular pathways. In cooperation with Dr. Umberto Dianzani's group (U. Amedeo Avogadro, Novara, Italy), we described in 1996 a new costimulatory molecule detected in human and mouse T cells by means of a monoclonal antibody, which was named H4. Recently, H4 has been cloned and named ICOS (for Inducible Costimulator). ICOS belongs to the same family as CD28 and CTLA-4, two molecules basic to the control of T cell responses, although ICOS has its own ligand, different expression pattern, and distinct functions.

The costimulatory mechanisms used by ICOS are not well

fócitos T de ratón y humanos mediante un anticuerpo monoclonal que fue denominada H4. Recientemente, H4 ha sido clonado y denominado ICOS ("Inducible Costimulator"). ICOS pertenece a la familia de CD28 y CTLA-4, dos moléculas fundamentales en el control de las respuestas de linfocitos T, pero ICOS tiene un ligando, patrones de expresión y funciones propios.

Los mecanismos de coestimulación mediada por ICOS no están bien establecidos. Sin embargo, su homología estructural con CD28, la conservación de un motivo de secuencia Y-M-x-M en el dominio citoplásmico, y la unión de PI-3 quinasa a ese motivo indican que ICOS y CD28 pueden usar algunas vías de señales comunes. Nuestros resultados en células de fenotipo Th2 permiten extender este paralelismo a algunas señales intracelulares muy importantes en la activación por antígeno. Así, hemos observado que ICOS potencia distintas señales muy inmediatas al reconocimiento de antígeno, tales como la activación de la tirosin-quinasa ZAP-70. Además, ICOS tiene un efecto sinérgico con el TCR/CD3 en la activación de las rutas de las MAP quinasas ERK, p38 y JNK (Feito et al, enviado). Esta coestimulación es, además, dependiente de la actividad de PI-3 quinasa y de la polimerización de actina, pero no de Proteína quinasa C o de Ciclosporina, y respalda algunos modelos propuestos recientemente para la coestimulación por CD28 que afectan a las señales tempranas de activación de la célula T. Actualmente estamos abordando distintas interrogantes, entre las que se cuentan establecer más precisamente las vías y moléculas implicados en la coestimulación por ICOS, y su grado de coincidencia con los mecanismos conocidos en CD28. En particular, nos interesa determinar la función de aquellos dominios moleculares que son claramente distintos en ICOS y CD28. Además, teniendo en cuenta la acción preferente de ICOS sobre la secreción de interleuquinas antiinflamatorias como IL-10, estamos interesados en analizar el efecto de ligandos de ICOS en modelos animales de enfermedades inflamatorias.

Coestimulación de linfocitos T por moléculas reguladoras de Complemento: Crry/p65 y MCP (CD46)

Crry y CD46 (MCP) son glicoproteínas de membrana pertenecientes a la familia de Reguladores de Activación del Complemento (RCA) que protegen a las células de la lisis por complemento (C') autólogo. Resultados de nuestro grupo, en

defined. However, its structural homology with CD28, the conservation of a Y-M-x-M motif in the cytoplasmic domain, or the binding of PI-3 kinase to this motif suggest that ICOS and CD28 might share certain signaling pathways. Using T cells of Th2 phenotype, we have obtained results extending the CD28-ICOS parallelism to early intracellular signals very important to antigen activation. Particularly, we have observed that ICOS augments some signals very close to antigen recognition, like the activation of the tyrosine kinase ZAP-70. Furthermore, ICOS synergizes with TCR/CD3-mediated signals for the activation of different MAP kinase pathways, including ERK, JNK, and p38 (Feito et al., submitted). In addition, ICOS-mediated costimulation depends on PI-3 kinase activity and actin polymerization, but not on Protein kinase C or Cyclosporin. Our results support some recent models on the mechanisms of CD28 costimulation involving early activation signals in T lymphocytes. We are currently interested in establishing more precisely the pathways and molecules implicated in ICOS costimulation, and how coincident they are with those already known in CD28. Particularly, we are interested in the functional study of those molecular domains that are clearly different in ICOS and CD28. Furthermore, since ICOS has a preference for enhancing the secretion of anti-inflammatory cytokines like IL-10, we are interested in analyzing the effect of ICOS ligands in animal models of inflammatory diseases.

T lymphocyte costimulation by complement regulatory proteins: Crry/p65 and MCP (CD46)

Crry and MCP (CD46) are membrane glycoproteins belonging to the family of Regulators of Complement Activation (RCA). These molecules protect cells from the attack by autologous complement (C'). Our results, in collaboration with Dr. Pilar Portolés and her group (CNBF, IS Carlos III), show that Crry/p65, a mouse molecule homologous to CD46, possesses clear costimulatory properties for T lymphocytes, in addition to its complement regulatory functions (see publications). Since CD46 is functionally homologous to Crry/p65, and is also the receptor for different pathogens including Measles virus and herpes virus 6, or bacteria like *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter*, or *Neisseria*, we thought of interest to analyze the potential of CD46 to modify T cell responses. Consequently, we addressed the question of whether CD46 might exert a costimulatory function on

colaboración con el grupo de la Dra. Pilar Portolés (CNBF, IS Carlos III), han demostrado que Crry/p56, una molécula murina homóloga de CD46, tiene, además de su función reguladora del complemento, una capacidad coestimuladora muy potente sobre la activación por ligandos del TCR/CD3 (ver publicaciones). Puesto que CD46 es funcionalmente homólogo de Crry, y es además el receptor de distintos patógenos que incluyen virus como los del sarampión y el herpes virus 6, o bacterias como *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter*, o *Neisseria*, creímos conveniente analizar su potencial para modificar las respuestas de los linfocitos T. Por tanto, nos planteamos analizar el papel coestimulador que CD46 podría ejercer en la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ humanos.

Hemos comprobado que CD46 coestimula la proliferación de linfocitos T CD4⁺ humanos inducida por anti-CD3 en sistemas de activación por anticuerpos fijados a la placa de cultivo. Experimentos de activación realizados en células Jurkat al coestimular con anticuerpos anti-CD46 muestran que los ligandos de esta molécula son capaces de modificar la activación de las células desde sus momentos iniciales, con incrementos en la fosforilación de cadenas zeta del complejo TCR/CD3 y de la activación de la tirosina quinasa ZAP-70. Curiosamente, no observamos cambios en los incrementos tempranos de calcio intracelular inducido por la activación del TCR. Asimismo detectamos que CD46 produce un incremento de la activación de ERK, p38 y JNK dependiente de la activación de TCR/CD3, o incluso independiente del TCR en el caso de p38. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en linfocitos T CD4⁺, en los que el coestímulo de CD46 produce un fuerte aumento en la producción de IL-2 y de IFN gamma, permaneciendo los niveles de IL-4 invariantes. Actualmente estamos analizando el papel de CD46 y sus dominios moleculares en distintos aspectos de la activación por TCR/CD3. Particularmente, nos interesa determinar la importancia de rutas de activación como p38, que han sido implicadas en la síntesis de IFN gamma, y la posibilidad de que CD46 favorezca de este modo la diferenciación de linfocitos hacia un patrón Th1.

La nueva función coestimuladora de CD46 que describimos pone de manifiesto la plurifuncionalidad de esta molécula, que al potenciar selectivamente la activación de los lin-

the activation and differentiation of CD4⁺ human T lymphocytes.

Indeed, CD46 enhances the proliferation of human CD4⁺ T lymphocytes induced by anti-CD3 antibodies. Activation experiments in Jurkat show that costimulation induced by anti-CD46 antibodies modify very early activation events, including the tyrosine phosphorylation of TCR/CD3 zeta chains, or the activation of the tyrosine kinase ZAP-70. In turn, we have not detected any significant change in the intracellular calcium released upon TCR activation. We have also detected that CD46 augments the activation of the ERK, JNK, or p38 MAP kinases induced by TCR/CD3 ligation, or some TCR-independent activation in the case of p38. These results extend to those obtained in CD4⁺ T cells showing that CD46 costimulation strongly enhances the secretion of cytokines like IL-2 or IFN gamma, but not IL-4. We are currently studying the role of CD46 and its molecular domains on different aspects of T cell activation. Particularly, we are interested in establishing the importance of distinct activation routes like p38, which are involved in the regulation of IFN gamma synthesis, and might have an impact on the differentiation of T cells towards a Th1 phenotype.

The novel costimulatory function described for CD46 underlines its many functions. In this way, CD46 might selectively potentiate T cell activation, counteracting the immune suppressive effects of certain pathogens, or, perhaps, the binding of pathogens to CD46 expressed in T lymphocytes might induce a direct, selective triggering of distinct activation pathways.

CD46 (MCP) as a cellular receptor of *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes is responsible for many acute infections, and is a frequent cause of suppurative cutaneous and respiratory tract infections, as well as of severe invasive infections like necrotizing fasciitis. In addition, these infections frequently have post-infection sequelae probably due to autoimmune phenomena, like glomerulonephritis or rheumatic fever. M proteins are fibrous proteins expressed on *Streptococcus* surfaces, and they are an important virulence factor. M proteins have a highly variable amino-terminal region, producing more than 80 known serotypes. M proteins bind different serum proteins belonging to the RCA family, including Factor H, FHL-1, and C4BP, and it has been described that they have also superantigenic properties. Previous data from other laboratories have shown that CD46,

locitos T puede contribuir a la regulación de la respuesta del Sistema Inmune, contrarrestando el efecto inmunosupresor de ciertos patógenos, e incluso es posible que la unión de patógenos a CD46 en linfocitos T produzca directamente la activación selectiva de ciertas vías celulares.

CD46 (MCP) como receptor celular de *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes es responsable de numerosas infecciones agudas, siendo causa frecuente de infecciones supurativas cutáneas y del tracto respiratorio, así como de infecciones invasivas severas como la fasciitis necrosante. Además, pueden tener secuelas postinfecciosas debidas probablemente a fenómenos autoinmunes, como glomerulonefritis o fiebres reumáticas. Las proteínas M son proteínas fibrilares expresadas en la superficie de *Streptococcus*, constituyendo un importante factor de virulencia. Las proteínas M tienen una región amino-terminal muy variable, que se traduce en la existencia de más de 80 serotipos conocidos. Las proteínas M unen distintas moléculas séricas pertenecientes a la familia RCA, incluyendo Factor H, FHL-1 y C4BP, y se ha descrito que tienen capacidad superantigénica. Estudios previos de otros grupos han mostrado que CD46, que también pertenece a la familia RCA, puede servir como receptor celular de aquellos *S. pyogenes* que expresan proteínas M del serotipo 6. Esta unión se llevaría a cabo por una región conservada, y no por la región amino-terminal de las proteínas M. Posteriormente, datos en otros sistemas experimentales y con otros serotipos han puesto en duda el papel de CD46 como receptor celular de *S. pyogenes*.

En colaboración con el grupo del Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba (CIB, CSIC), iniciamos un estudio de la unión de CD46 a *S. pyogenes* de distintos serotipos, y la relación con los sitios de unión de otras moléculas reguladoras de complemento. Para ello construimos una proteína de fusión correspondiente a la región extracitoplásmica de CD46, y generamos anticuerpos específicos frente a esta región de la molécula. Hemos comprobado que, efectivamente, CD46 se une a *S. pyogenes*, pero que tiene una gran variabilidad en cuanto a su afinidad hacia proteínas M de distintos serotipos: Muy alta o alta hacia M18 y M4, y baja hacia el serotipo M6 que había sido descrito previamente como capaz de interactuar con CD46. Otros serotipos como M29 y M30 no unen CD46 de modo detectable.

which is also a member of the RCA family, serves as the cellular receptor for *S. pyogenes* expressing M proteins of serotype 6. According to these data, this binding would involve a conserved region of M proteins, rather than the amino-terminal region. Later results obtained in other experimental systems and other serotypes have cast some doubts on the ability of CD46 to serve as a cellular receptor for *S. pyogenes*.

In collaboration with Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba (CIB, CSIC), we have begun to study the binding of CD46 to *S. pyogenes* of different serotypes, and the relationship of the binding site with those of other complement regulatory proteins. To this end, we have made a fusion protein encompassing the extracytoplasmic domains of CD46, and we have obtained antibodies specific for this region of the molecule. Using these tools, we have observed that CD46 binds to *S. pyogenes*, although it shows a great variability concerning its affinity to M proteins of different serotypes: Thus, it has very high or high affinity to M18 or M4, and low to the M6 serotype previously described as interacting with CD46. Other serotypes like M29 or M30 do not bind CD46.

To localize the binding site, we have analyzed the inhibition of CD46 binding to *S. pyogenes* by complement regulatory proteins of the serum, like C4BP or Factor H. Only C4BP blocks the binding, suggesting that CD46, like C4BP, binds M proteins through the variable amino-terminal region, and not through repeats C as previously observed, where Factor H binds. To confirm this finding, as well as to determine the superantigenic properties of M proteins, we are currently obtaining different M proteins expressed as recombinant constructs in heterologous systems.

Para localizar el sitio de unión, se ha analizado la inhibición de la unión de CD46 a *S. pyogenes* por proteínas reguladoras del complemento en suero, como C4BP y Factor H, que se unen a las proteínas M. Sólo C4BP bloquea la unión de CD46 a proteínas M, lo que sugiere que, igual que igual que C4BP, la unión de CD46 se realiza por la región variable amino-terminal, y no, como se había postulado anteriormente para CD46, por las repeticiones C de las proteínas M a las que se une el Factor H. Para confirmar esta posibilidad, y para determinar su posible capacidad superantigénica, estamos generando actualmente distintas proteínas M recombinantes en sistemas heterólogos.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

— FIS, FIS98/0037-02 (1998-2000)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

— **Gabriel Criado Carrasco.** Análisis del papel de CD4 murino en la activación de linfocitos T: Funciones dependientes e independientes de tirosina-quinasa. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Director: José María Rojo Hernández.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Savarino, A., Bottarel, F., Calosso, L., Feito, M. J., Bensi, T., Bragardo, M., Rojo, J. M., Pugliese, A., Abbate, I., Capobianchi, M.R., Dianzani, F., Malavasi, F., and Dianzani, U. (1999). Effects of the human CD38 glycoprotein on the early stages of the HIV-1 replication cycle. *FASEB J.* 13, 2265-2276.
- Criado, G., Feito, M. J., Ojeda, G., Sánchez, A., Janeway, C. A., jr., Portolés, P., and Rojo, J.M. (2000). Variability of invariant mouse CD3E chains detected by anti-CD3 antibodies. *Eur. J. Immunol.* 30, 1469-1479.
- Criado, G., and Rojo, J.M (2000). CD4: Asociaciones moleculares y papel en la respuesta a antígeno. *Inmunología*, 19, 122-133.
- Fernández-Centeno, E., Ojeda, G., Rojo, J.M., and Portolés, P. (2000). Crpy/p65, a membrane complement regulatory protein has costimulatory properties on mouse T cells. *J. Immunol.* 166, 4533-4542.

Adhesión Celular en el Sistema Inmune *Cell Adhesion in the Immune System*

ÁNGELES GARCÍA PARDO

Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigadora de Carrera / *Staff Scientist*

BENITO CASANOVA HERNÁNDEZ

TERESA DE LA FUENTE SÁNCHEZ (Hasta XII-2000)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

MERCEDES GARCÍA GILA

ALFREDO MAQUEDA FERNÁNDEZ (Desde X-2000)
JOSÉ VICENTE MOYANO IDOETA
B. Predoctorales / *Graduate Students*

FÉLIX ALEGRE GARRIDO (Hasta XII 2000)

Investigador Visitante/*Visiting Scientist*

MERCEDES HERNÁNDEZ DEL CERRO

Personal Técnico / *Technician*



Palabras clave: Fibronectina, adhesión celular, integrina $\alpha 4\beta 1$ señalización intracelular, apoptosis

Interacción de linfocitos con el dominio de unión a heparina III (Hep III) de fibronectina

Las interacciones de linfocitos con fibronectina (Fn) regulan muchas funciones celulares, como la reorganización del citoesqueleto, migración, localización en tejidos específicos y supervivencia. La Fn contiene varios sitios de unión a células que unen fundamentalmente las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$. Nuestro laboratorio está interesado en las interacciones mediadas por $\alpha 4\beta 1$ y sus consecuencias biológicas.

Hemos descrito previamente que el reconocimiento de algunos sitios de Fn por $\alpha 4\beta 1$ requiere previa activación de la integrina con Mn^{2+} o el Acm anti- $\beta 1$ TS2/16. Recientemente, hemos mostrado que la región Hep III de Fn constituye un nuevo dominio de adhesión celular y contiene dos sitios activos: H2, ligando para $\alpha 4\beta 1$ activada, y HBP/III5, que une proteoglicanos tipo condroitin-sulfato (CSPG). Hemos propues-

Keywords: Fibronectin, cell adhesion, $\alpha 4\beta 1$ integrin, intracellular signaling, apoptosis

Lymphocyte interaction with the heparin-binding domain III (Hep III) of fibronectin

Lymphocyte interactions with fibronectin (Fn) regulate many cellular programmes including cytoskeleton reorganization, migration, localization in specific tissues and survival. Fn contains several cell binding sites which bind mainly $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins. Our laboratory is interested in the interactions mediated by $\alpha 4\beta 1$ and their biological consequences.

We have previously shown that the recognition of some Fn cell-binding sites by $\alpha 4\beta 1$ requires previous activation of the integrin with Mn^{2+} or the anti- $\beta 1$ mAb TS2/16. We recently established that the Hep III Fn region constitutes a novel cell adhesion domain and contains two active sites: H2, a ligand for activated $\alpha 4\beta 1$ and HBP/III5, which binds chondroitin-sulfate proteoglycans (CSPG). We proposed a model in which CSPG is a physiological modulator of $\alpha 4$ function. In this model, Mn^{2+} would

to un modelo en que CSPG es un regulador fisiológico de la función de $\alpha 4 \beta 1$. En este modelo, el Mn^{2+} induciría una activación parcial de $\alpha 4$ que requeriría la contribución de CSPG. Sin embargo el TS2/16 produciría una $\alpha 4$ totalmente activada que ya no necesita CSPG.

Hemos estudiado también la reorganización de citoesqueleto en células T Jurkat tras la activación con Mn^{2+} o TS2/16, y adhesión a fragmentos específicos de Fn. El tratamiento con Mn^{2+} inducía filamentos de actina largos y desorganizados, mientras que el TS2/16 producía células mayores y redondeadas con cortos filamentos de actina bien organizados sobre el perímetro celular. La condroitinasa inhibía el patrón inducido por Mn^{2+} pero no afectaba el inducido por TS2/16. Nuestros estudios indican que $\alpha 4$ induce diferente señalización intracelular dependiendo del estado de activación. Estos mecanismos se están estudiando actualmente.

Papel del dominio Hep III de Fn en la formación de fibras de estrés y adhesiones focales

La adhesión celular a la Fn induce formación de fibras de estrés y contactos focales y esto requiere la interacción de $\alpha 5 \beta 1$ con el dominio central de unión a células de Fn y del síndecano con el dominio Hep II. Nosotros estamos estudiando el papel del dominio Hep III de Fn y la integrina $\alpha 4 \beta 1$ en esta reorganización del citoesqueleto.

Estamos utilizando la línea celular de melanoma SKMEL-178, que expresa $\alpha 4 \beta 1$ y $\alpha 5 \beta 1$. La adhesión de estas células al fragmento FN-III7-10 via $\alpha 5 \beta 1$ induce fibras de estrés finas y contactos focales débiles. La co-inmovilización del fragmento FN-III4-5 (ligando de $\alpha 4 \beta 1$ con FN-III7-10, inhibía completamente la inducción de fibras de estrés de forma dosis-dependiente, resultando en células sin forma definida. Para determinar el papel de los dos sitios activos presentes en FN-III4-5 (H2 y HBP/III5) en esta señal inhibitoria, hemos empleado péptidos sintéticos conteniendo estos sitios y técnicas de mutación puntual. Hemos encontrado que ambos sitios están implicados en esta señalización.

Actualmente estamos estudiando el mecanismo intracelular implicado en esta respuesta. Los trabajos iniciales indican que Rho, un miembro de la familia de GTPasas pequeñas, puede estar involucrado. Estos resultados sugieren que las señales inducidas por $\alpha 4 \beta 1$ pueden inhibir la señalización

induce a partially active $\alpha 4$ integrin which requires CSPG for strong adhesion. TS2/16 however would render a fully active $\alpha 4$ with no further need for CSPG cooperation.

We have also studied the actin cytoskeleton reorganization induced upon activation of Jurkat T lymphocytes with Mn^{2+} or TS2/16 and attachment to specific Fn fragments. Treatment with Mn^{2+} resulted in fine, long and disorganized actin filaments. In contrast TS2/16 activation induced cell spreading and rounding with formation of well organized actin microspikes around the cell. Chondroitinase interfered with the Mn^{2+} -induced pattern but had no effect on TS2/16-activated cells. Our studies indicate that $\alpha 4$ induces different intracellular signals depending on the activation state. This is currently under study.

Role of Fn Hep III domain in stress fiber and focal contact formation

Cell attachment to Fn induces formation of stress fibers and focal adhesions and this requires $\alpha 5 \beta 1$ integrin interaction with the Fn central cell binding domain and syndecan binding to the Hep II domain. We are interested in studying the role of the Hep III Fn domain and $\alpha 4 \beta 1$ integrin on this cytoskeletal reorganization.

We are using the melanoma cell line SKMEL-178, which expresses $\alpha 4 \beta 1$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins, for these studies. Melanoma cells attached to the recombinant Fn fragment FN-III7-10 via $\alpha 5$ and formed fine stress fibers and weak focal adhesions. Co-immobilisation of FN-III4-5 fragment (a ligand for $\alpha 4 \beta 1$) with FN-III7-10 completely inhibited stress fiber induction in a dose dependent manner, resulting in cells with no defined shape that extended lamellipodia. To determine the role of the two active sites present in FN-III4-5 (H2 and HBP/III5) in the observed inhibitory signal, we used synthetic peptides containing these sites and point mutation techniques. Our results show that both sites are involved in this regulatory signal.

Work in progress in the laboratory is aimed to determine the intracellular pathway involved in the inhibitory effect induced via $\alpha 4$ integrin. Our preliminary results indicate that Rho, a member of the small GTPase family is involved. Our results suggest that signals delivered by $\alpha 4$ integrin may inhibit signaling induced via $\alpha 5$ integrin, thus establishing a complex and coordinated regulation of integrin function.

mediada por $\alpha 5\beta 1$, estableciendo por tanto una regulación compleja y coordinada de la función de las integrinas.

Regulación de la apoptosis en la leucemia linfocítica crónica B por integrinas

La leucemia linfocítica crónica B (LLC-B) es la forma más común de leucemia en países occidentales y consiste en la acumulación de linfocitos B malignos que tienen sus mecanismos de apoptosis desregulados. Además la resistencia al tratamiento por drogas aumenta a medida que progresa la enfermedad. Nosotros estamos estudiando las señales de supervivencia generadas via integrinas, particularmente $\alpha 4\beta 1$

Recientemente hemos descrito que la adhesión de células LLC-B al fragmento H89 de Fn, ligando de $\alpha 4\beta 1$, previene su apoptosis espontánea in vitro y aumenta el cociente Bcl-2/Bax. Hemos ampliado estos estudios al efecto de la interacción $\alpha 4\beta 1$ /H89 sobre la respuesta de células LLC-B a drogas terapéuticas. Las células LLC-B cultivadas sobre H89 durante el tratamiento con 2-cloro-deoxiadenosina o fludarabina mostraban mayor viabilidad que cultivadas sobre el control poli-lisina. La diferencia de las medias era estadísticamente significativa para todas las dosis de fludarabina empleadas y existía correlación con el aumento observado en la expresión de Bcl-xL en células sobre H89. Estos resultados indican que Bcl-xL está implicado en las señales de supervivencia inducidas por $\alpha 4\beta 1$ y podría contribuir a la resistencia progresiva observada en la LLC-B. Actualmente estamos estudiando otros mediadores de esta resistencia fundamentalmente algunas proteína-quinazas.

Identificación y caracterización de genes expresados diferencialmente en LLC-B

La progresión de la LLC-B está asociada frecuentemente a alteraciones cromosómicas que afectan a genes que pueden ser responsables del pronóstico de la enfermedad. Nuestro laboratorio está usando la técnica de expresión diferencial de mRNA para estudiar genes que tengan una expresión característica en la LLC-B. En los primeros análisis, hemos identificado el gen supresor tumoral RARRES3 (gen de respuesta del receptor de ácido retinoico) como relacionado con la LLC-B. Hemos encontrado también una correlación

Regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia by integrins

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is the most common type of leukemia in western countries and consists in the accumulation of malignant B lymphocytes due to defective apoptosis regulation. In general, there is also an increased resistance to drug treatment as the disease progresses. We are interested in studying the survival signals delivered to B-CLL cells via integrins, particularly $\alpha 4\beta 1$

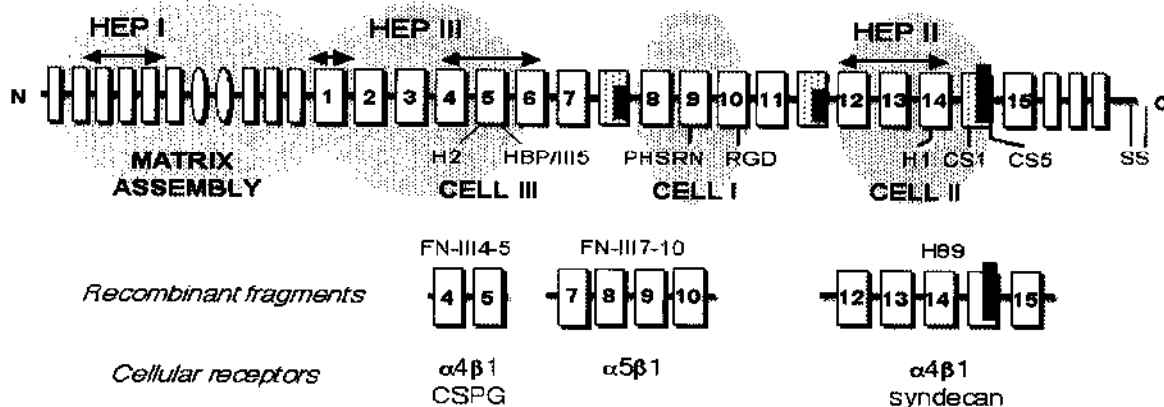
We have recently shown that adhesion of B-CLL cells to the fibronectin fragment H89, a ligand for $\alpha 4\beta 1$ integrin, prevents their spontaneous apoptosis in vitro, and upregulates the Bcl-2/Bax ratio. We have extended these studies to the effect of $\alpha 4\beta 1$ /H89 interaction on the response of B-CLL cells to therapeutic drugs. B-CLL cells cultured on H89 during treatment with 2-chloro-deoxyadenosine or fludarabine consistently showed higher viability than cells cultured on the control poly-lysine. The mean differences were statistically significant for all doses of fludarabine used and correlated with the observed increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL on H89-cultured cells. Our results indicate that Bcl-xL is involved in the survival signals induced by $\alpha 4\beta 1$ ligation and may contribute to the progressive drug-resistance observed in B-CLL. Current work in the laboratory is aimed to determine other mediators of this resistance, particularly certain protein-kinases.

Identification and characterization of differentially expressed genes in B-CLL

B-CLL progression is usually associated with chromosomal alterations affecting genes which may be responsible for the outcome of the disease. Our laboratory is using the mRNA differential display technique to study genes which are differentially expressed in B-CLL. In our initial screening we have identified the tumor suppressor Retinoic Acid Receptor Responder 3 (RARRES 3) gene as a B-CLL related gene. We have also found a correlation between down-regulation of RARRES3 and progression of B-CLL. Decreased RARRES 3 expression was also observed in 10/10 cases of acute B lymphocytic leukemia (ALL) indicating that this gene may play an important role in the progression of B lymphoproliferative disorders. Further characterization of this and other differentially expressed genes in B-CLL is currently in progress.

entre la disminución de la expresión de este gen y la progresión de la enfermedad. También hemos observado una expresión disminuida de RARRES 3 en 10/10 casos de leucemia linfocítica aguda (LLA), lo que indica que este gen podría jugar un papel importante en la progresión de enfermedades linfoproliferativas. Actualmente se está realizando la caracterización adicional de éste y otros genes expresados diferencialmente en la LLC-B.

Fibronectin and active fragments



Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, 08.1/0012/1997 (1998-2000)
- CAM, 08.1/0028/99 (2000)
- CICYT, SAF97-0064-C03-02 (1997-2000)
- CICYT, SAF 2000-0124 (2000-2003)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- De la Fuente, M.T., Casanova, B., García-Gila, M., Silva, A., and García-Pardo, A. (1999). Fibronectin interaction with $\alpha 4 \beta 1$ integrin prevents apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia*, 13, 266-274.
- Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendía, A., Pérez-Alvarez, M. J., Langa, C., López, L. A., Fabra, A., García-Pardo, A., Vera, S., Letarte, M., and Bernabeu, C. (1999). Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration and adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 614-623.
- Moyano, J. V., Carnemolla, B., Albar, J. P., Leprini, A., Gaggero, B., Zardi, L., and García-Pardo, A. (1999). Cooperative role for activated $\alpha 4 \beta 1$ integrin and chondroitin sulfate proteoglycans in cell adhesion to the heparin III domain of fibronectin. Identification of a novel heparin and cell binding sequence in repeat III5. *J. Biol. Chem.* 274, 135-142.
- Bustos, M., Sangro, B., Alzuguren, P., Gil, A. G., Ruiz, J., Beraza, N., Qian, C., García-Pardo, A., and Prieto, J. (2000). Liver damage using suicide genes. A model for oval cell activation. *Am. J. Pathol.* 157, 549-559.

Biología Celular de las Moléculas de Adhesión

Cell Biology of Adhesion Molecules

JOAQUÍN TEIXIDÓ

Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

M^a MAR ROBLEDO LÓPEZ

B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

RUBÉN A. BARTOLOMÉ CONDE (Desde VII-2000)

ANDRÉS HIDALGO ALONSO (Hasta I-2000)

NATIVIDAD RUIZ VELASCO (Hasta VI-1999)

FRANCISCO SANZ RODRÍGUEZ (Hasta IX-1999)

NATALIA WRIGHT (Desde VI-1999)

B. Predoctorales / Graduate Students

Palabras clave: Adhesión celular, integrinas, quimioquinas, mieloma.

Keywords: Cell Adhesion, integrins, chemokines, myeloma

Estudios de estructura-función en la integrina $\alpha 4 \beta 7$

Structure-function studies on the $\alpha 4 \beta 7$ integrin

La integrina $\alpha 4 \beta 7$ es un receptor de adhesión celular expresada principalmente en linfocitos, la cual participa en el tráfico linfocitario hacia el intestino y tejido linfoide asociado, tal como las Placas de Peyer, tras su interacción con MAdCAM-1 expresado en las células endoteliales altas. La expresión de MAdCAM-1 se incrementa en áreas de inflamación intestinal en modelos murinos de colitis, mientras que anticuerpos frente a $\beta 7$ y MAdCAM-1 reducen inflamación en el colon de ratones scid, sugiriendo la participación de $\alpha 4 \beta 7$ /MAdCAM-1 en el reclutamiento linfocitario hacia el intestino en inflamación crónica. Hemos expresado subunidades $\alpha 4$ mutadas junto con subunidades $\beta 7$ normales en células K562, y analizado el efecto de estas mutaciones en adhesión celular a sMAdCAM-1-Ig. Los transfectantes que expresaban la subunidad $\alpha 4$ mutada en 187Tyr mostraron

The integrin $\alpha 4 \beta 7$ is a cell adhesion receptor mainly expressed on lymphocytes which mediates their homing to intestine and associated lymphoid tissue, such as Peyer's patches, upon interaction with its ligand MAdCAM-1 on high endothelial venules. MAdCAM-1 expression is increased in areas of intestinal inflammation in mouse models of colitis, and antibodies to $\beta 7$ and MAdCAM-1 reduce inflammation in the colon of scid mice, suggesting that $\alpha 4 \beta 7$ /MAdCAM-1 interactions are involved in leukocyte recruitment to gut in chronic inflammatory disease. We expressed mutant $\alpha 4$ and wild type $\beta 7$ chains in K562 cells and analyzed the effect of mutations on cell adhesion to soluble MAdCAM-1 (sMAdCAM-1-Ig). Transfectants expressing mutated $\alpha 4$ at 187Tyr displayed a substantial decrease in adhesion to this ligand, which was associated with reduced $\alpha 4 \beta 7$ /sMAdCAM-1-Ig interaction, as determined by soluble binding assays. Mutations at $\alpha 4$ 152Gln153Asp also affected trans-

una sustancial disminución en la adhesión a este ligando, lo cual se asoció con una reducción en la interacción $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1, determinándose en ensayos de unión en solución. Mutaciones en $\alpha 4$ 152Gln153Asp afectaron asimismo la adhesión a sMAdCAM-1-Ig, pero sin involucrar alteraciones en la unión $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1. La mutación en $\alpha 4$ 187Tyr bloqueó la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 7$ a CS-1/fibronectin, un ligando adicional para $\alpha 4\beta 7$. Estos resultados indican que el residuo $\alpha 4$ 187Tyr juega un importante papel en la adhesión linfocitaria dependiente de $\alpha 4\beta 7$, representando asimismo una potencial diana para intervención terapéutica en patologías inflamatorias.

Actualmente estamos investigando el papel que la quimiocina SDF-1 juega en la adhesión linfocitaria dependiente de $\alpha 4\beta 7$, lo cual podría modular el tráfico de los linfocitos a tejido linfoide asociado al intestino.

VLA-4 en el mieloma múltiple

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia que afecta a células B diferenciadas, las cuales se asocian a células estromales de la médula ósea (MO). La integrina VLA-4 participa en la adhesión de células de mieloma al estroma de MM en la MO. La región CS-1 de fibronectina (FN) y VCAM-1 representan los ligandos principales de VLA-4, y ambos se expresan en las células estromales en el MM. La región H1 representa un sitio adicional de interacción de VLA-4 con la FN. Hemos empleado los fragmentos FN-H89 y FN-H0 de fibronectina, los cuales contienen las regiones CS-1 y H1, o sólo el sitio H1, respectivamente, así como VCAM-1 soluble (sVCAM-1), para caracterizar las diferentes vías de adhesión mediadas por VLA-4 que utilizan las células de mieloma para unirse al estroma. Las células CD38^{high}CD45RA⁻ de MO de MM, así como diversas líneas celulares derivadas de mieloma, se unieron específicamente a FN-H89, FN-H0 y sVCAM-1 y su adhesión dependiente de VLA-4 fue notablemente aumentada por anticuerpos que incrementan la afinidad de integrinas VLA- β 1. Estos resultados indican que las células de mieloma utilizan VLA-4 para interactuar con CS-1/FN, H1/FN y VCAM-1 en el estroma de MM, y que esta función adhesiva puede ser potencialmente aumentada, lo cual podría influenciar la localización de las células de mieloma en la médula ósea.

fectant adhesion to sMAdCAM-1-Ig, but did not involve alterations of $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1 binding. Mutation of $\alpha 4$ 187Tyr abolished $\alpha 4\beta 7$ -mediated cell adhesion to CS-1/fibronectin, an additional ligand for $\alpha 4\beta 7$. These results indicate that $\alpha 4$ 187Tyr plays important roles in $\alpha 4\beta 7$ -mediated leukocyte adhesion, providing a potential target for therapeutic intervention in inflammatory pathologies.

We are currently investigating the role of the chemokine SDF-1 on $\alpha 4\beta 7$ -dependent lymphocyte adhesion, which could contribute to lymphocyte homing to gut-associated lymphoid tissue.

VLA-4 function on multiple myeloma

Multiple myeloma (MM) is a neoplasia of terminally differentiated B cells that are mainly found in the bone marrow (BM) in close association with stromal cells. The integrin integrin VLA-4 mediates attachment of myeloma cells to multiple myeloma BM stroma. The CS-1 region of fibronectin (FN) and VCAM-1 are main ligands for VLA-4 and are both expressed on MM stroma. The H1 region represents an additional binding site for VLA-4 on FN. We employed FN fragments FN-H89 and FN-H0, that contain either the CS-1 and H1, or only the H1 sites, respectively, as well as soluble VCAM-1 (sVCAM-1), to characterize VLA-4-mediated adhesion pathways used by myeloma cells to attach to MM stroma. CD38^{high}CD45RA⁻ cells from MM bone marrow, and several myeloma-derived cell lines specifically adhered to FN-H89, FN-H0 and sVCAM-1, and their VLA-4-dependent adhesion was substantially upregulated by antibodies which increase affinity of VLA- β 1 integrins. These results indicate that myeloma cells use VLA-4 to interact with CS-1/FN, H1/FN and VCAM-1 on MM stroma, and that its function can be potentially upregulated, which might influence myeloma cell localization in the bone marrow.

We have recently shown (Sanz-Rodríguez et al. in press) that SDF-1 modulates VLA-4-dependent myeloma cell adhesion, suggesting that this chemokine could control myeloma cell trafficking to the bone marrow.

Expression and function of chemokine receptors on melanoma cells

The chemokines are involved in cell migration and activation of several signalling pathways, and play important roles in

Por otra parte hemos mostrado recientemente (Sanz-Rodríguez et al. en prensa) que la quimioquina SDF-1 modula la adhesión dependiente de VLA-4 de células de mieloma, sugiriendo que SDF-1 podría controlar el tráfico de las células de mieloma hacia la médula ósea.

Expresión y función de receptores de quimioquinas en células de melanoma

Las quimioquinas están implicadas en migración celular y en activación de diversas vías de señalización y juegan un papel importante en patologías inflamatorias, hematopoyesis, rechazo tumoral y en infección por HIV-1. Además de las células tumorales, el microambiente tumoral incluye células inflamatorias, tales como macrófagos y linfocitos T, los cuales son atraídos por quimioquinas secretadas por las células tumorales. La quimioquina Mig (CXCL9) se encuentra en el microambiente tumoral en melanoma, con lo que potencialmente podría unirse a su receptor CXCR3 en células presentes en el tumor. Por otro lado, SDF-1 α se expresa en la mayoría de los tejidos y ejerce sus funciones tras la interacción con su receptor CXCR4. En un estudio reciente (enviado) hemos mostrado que diferentes líneas celulares humanas de melanoma, así como células de melanoma obtenidas de nódulos linfáticos macroscópicamente infiltrados, expresan CXCR3 y CXCR4. Asimismo demostramos que Mig activa las Rho GTPasas RhoA y Rac1, induce una reorganización del citoesqueleto de actina, y provoca quimiotaxis y modulación de la adhesión de células de melanoma dependiente de las integrinas VLA-5 y VLA-4 a fibronectina. Adicionalmente, Mig y SDF-1 α activaron las MAP quinases p44/42 and p38 en células de melanoma. La expresión de receptores CXCR3 y CXCR4 funcionales en células de melanoma sugiere que estos receptores podrían contribuir a la motilidad celular durante procesos de invasión, así como a la regulación de proliferación y supervivencia celular.

inflammatory diseases, hematopoiesis, tumour rejection and HIV-1 infection. In addition to tumour cells, the tumour micro-environment includes inflammatory cells such as macrophages and T lymphocytes, which are attracted by chemokines secreted by tumour cells. Mig (CXCL9) is found in the tumour micro-environment in melanoma, and therefore it potentially could bind to its receptor on cells present in the tumour. On the other hand, SDF-1 α is expressed on most tissues and exerts its functions upon interaction with its receptor CXCR4. In a recent study (submitted) we show that several human melanoma cell lines and melanoma cells from macroscopically infiltrated lymph nodes express CXCR3 and CXCR4. In addition, we demonstrate that Mig activates the small GTPases RhoA and Rac1, induces a reorganization of the actin cytoskeleton, and triggers melanoma cell chemotaxis and modulation of integrin VLA-5- and VLA-4-dependent adhesion to fibronectin. Furthermore, CXCR4 mediated SDF-1 α -triggered modulation of integrin adhesion to fibronectin. Additionally, Mig and SDF-1 triggered activation of MAP kinases p44/42 and p38 on melanoma cells. Expression of functional CXCR3 and CXCR4 receptors on melanoma cells suggest that they might contribute to cell motility during invasion, as well as to regulation of cell proliferation and survival.

Proyectos Financiados/Funding Agencies

- DGICYT, PM95-0017 (1996-1999)
- CM, 08.3/0024/1.98 (1999-2001)
- CICYT, SAF99-0057 (1999-2002)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Andrés Hidalgo Alonso**. Modulación de la actividad de la integrina VLA-4 por la quimioquina SDF-1 en progenitores hematopoyéticos. Relaciones funcionales de VLA-4 y CD44 en hematopoyesis. Universidad Autónoma de Madrid. 1999. Director: Joaquín Teixidó.
- **Francisco Sanz Rodríguez**. Modulación de la actividad de la integrina VLA-4 por la quimioquina SDF-1 y TGF-beta1. Universidad Autónoma de Madrid. 2000. Director: Joaquín Teixidó.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Jia-G-Q., Gonzalo, J.-A., Hidalgo, A., Wagner, D., Cybulsky, M., and Gutiérrez-Ramos, J.-A. (1999). Selective eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *Int. Immunol.* *11*, 1-10.
- Sanz-Rodríguez, F., Ruiz-Velasco, N., Pascual-Salcedo, D., and Teixidó, J. (1999). Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *Br. J. Haematol.* *107*, 825-834.
- Puig-Kröger, A., Sanz-Rodríguez, F., Longo, N., Sánchez-Mateos, P., Botella, L., Teixidó, J., Bernabeu, C., and Corbí, A. (2000). Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J. Immunol.* *165*, 4338-4345
- Ruiz-Velasco, N., Guerrero-Esteo, M., Briskin, M.J., and Teixidó, J. (2000). The alpha4 integrin subunit Tyr187 has a key role in alpha4beta7-dependent cell adhesion. *J. Biol. Chem.* *275*, 7052-7059.

Receptores de Membrana

Membrane Receptors

CARMELO BERNABÉU QUIRANTE

Jefe de Grupo / Group Leader

LUISA MARÍA BOTELLA

ANGEL LUIS CORBÍ LÓPEZ

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

JUAN PEDRO LÓPEZ-BOTE

Doctor Vinculado / Associated Scientist

JULIA GÜNTHER (IV - XI-2000)

RUTH ALVAREZ (XI - XII-2000)

Investigadores Visitantes / Visiting Scientists

CARLOS RIUS SOLERA (Hasta XI-1999)

BEATRIZ VELASCO LAORGA (Hasta VI-2000)

FRANCISCO SANZ RODRÍGUEZ (Desde X-2000)

B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

MERCEDES GUERRERO ESTEO

AINHOA LETAMENDÍA URRACA (Hasta IV-1999)

AMAYA PUIG KRÖGER

TILMAN SÁNCHEZ ELSNER

MIGUEL RELLOSO CERECEDA (Desde I-2000)

B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

CARMEN LANGA POZA

Personal Técnico / Technician

Palabras clave: TGF-beta, endoglina, endotelio, integrinas, células dendríticas

Keywords: TGF-beta, endoglin, endothelium, integrins, dendritic cells

Estudios funcionales de endoglina: una proteína implicada en la telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo 1

Functional studies on endoglin: a protein involved in the hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1.

Mutaciones en el gen de la endoglina dan lugar a la telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo 1 (HHT1), una enfermedad vascular (OMIM 187300). Endoglina es un componente del sistema receptor del factor de crecimiento transformante (TGF- β) que se expresa abundantemente en células endoteliales, y en niveles más bajos en fibroblastos y en células del músculo liso, lo que sugiere que estos linajes pueden estar afectados en la displasia vascular de HHT1. La sobreexpresión de endoglina en fibroblastos de ratón NCTC929 conduce a una disminución de la migración celular en ensayos de quimiotaxis y cicatrización de heridas, *in vitro*, así como a

Endoglin is the gene mutated in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT1), a dominantly inherited vascular disorder (OMIM 187300). Endoglin glycoprotein is a component of the transforming growth factor type β (TGF- β) receptor system which is highly expressed by endothelial cells, and at lower levels on fibroblasts and smooth muscle cells, suggesting the involvement of these lineages in the HHT1 vascular dysplasia. Overexpression of endoglin in mouse NCTC929 fibroblasts led to decreased migration in chemotactic and wound healing assays, as well as changes in the cellular morphology. When plated on uncoated surfaces, endoglin transfectants formed intercellular

cambios en la morfología celular. Los transfectantes de endogлина forman agregados intercelulares cuando se plaquean en placas de cultivo sin sustrato. En estos casos la endogлина no se localiza específicamente en las uniones célula-célula, sino que su distribución es homogénea en toda la superficie celular. Aunque la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y de un epítipo de activación de $\alpha 5\beta 1$ no se ven alterados, un anticuerpo policlonal contra $\alpha 5\beta 1$, es capaz de inhibir la formación de los agregados celulares. Este resultado sugiere la implicación de ligandos de la integrina. En apoyo de esta hipótesis, cuando se usan fibronectina, laminina, o un fragmento de 80 kDa de fibronectina que contiene la región RGD como sustratos para plaquear las células, éstos son capaces de evitar la agregación celular. Además, la síntesis del inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), y en menor escala la de fibronectina, se inhiben en los transfectantes de endogлина. Por tanto la presencia de endogлина en fibroblastos de ratón NCTC929 está asociada con una producción reducida de ciertos componentes de la matriz extracelular (ECM), lo que puede explicar los cambios en la morfología, la migración y la formación de agregados intercelulares.

Expresión de formas normales y truncadas de endogлина humana

Endogлина es una glicoproteína transmembranal de 655 aminoácidos que se expresa en la superficie de células endoteliales como un homodímero unido por puentes disulfuro, aunque no se sabe qué cisteínas son las responsables de la dimerización de endogлина. Mutaciones que afectan a la región codificante de endogлина son responsables de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1 (HHT1), una enfermedad vascular hereditaria. Muchas de estas mutaciones, aunque se tradujeran conducirían a la formación de formas truncadas de la proteína. Por tanto, resulta de gran interés el averiguar la expresión proteica de distintas formas truncadas de endogлина. Se han usado infecciones de virus recombinantes de *Vaccinia*, así como transfecciones transitorias con vectores de expresión para sintetizar formas normales y truncadas de endogлина. Los mutantes truncados se clasificaron en tres grupos diferentes: a) Formas que no producen transcritos estables, b) Formas que producen transcritos estables pero cuya proteína no se secreta; y c) Formas que se secretan como

clusters, being endoglin not specifically localized to the cell-cell junctions, but homogenously distributed on the cellular surface. Although the expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin and of an activation epitope of $\beta 1$ integrin were unchanged, a polyclonal antibody to $\alpha 5\beta 1$ integrin was able to inhibit cluster formation, suggesting the involvement of integrin ligand/s. In fact, coating with fibronectin, laminin, or an RGD-containing 80kDa fragment of fibronectin were able to prevent the cellular clustering. Furthermore, synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), and to a weak extent that of fibronectin, were inhibited in endoglin transfectants. Thus, the presence of endoglin in mouse NCTC929 fibroblasts is associated with reduced production of certain extracellular matrix (ECM) components, which might explain their altered morphology, migration and intercellular cluster formation.

Expression of normal and truncated forms of human endoglin.

Endoglin is a transmembrane glycoprotein of 633 amino acids expressed at the surface of endothelial cells as a disulfide linked homodimer, but the specific cysteines involved in endoglin dimerization are unknown. Mutations in the coding region of the endoglin gene are responsible for the hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT1), a dominantly inherited vascular disorder. Many of these mutations, if translated would lead to truncated forms of the protein. Thus, it is of interest to assess the protein expression of different truncated forms of endoglin. In vitro or in vivo infections with recombinant vaccinia virus, as well as transient transfections with expression vectors, were used to express normal and truncated forms of endoglin. Truncated mutants could be classified in three different groups: a) Those that do not produce stable transcripts; b) Those that produce stable transcripts, but do not secrete the protein; and c) Those that secrete a soluble dimeric protein. This is the first time that a recombinant truncated form of endoglin is found to be expressed in a soluble form. Since a chimeric construct encoding the amino terminal sequence of PECAM-1 antigen fused to residues 11e281-11e658 of endoglin, also yielded a dimeric surface protein, these results suggest that cysteines contained within the Cys330-Cys412 fragment are involved disulfide bond formation. Infection with vaccinia recombinants encoding an HHT1 mutation, did not affect the expression of the normal endoglin, nor revealed association of the recombinant soluble form with the transmembrane

proteína soluble dimerica, siendo esta la primera vez que se han expresado formas recombinantes truncadas de endoglina en forma soluble. Puesto que una construcción quimérica que contiene la secuencia amino terminal de PECAM-1 unida al segmento de Ile281-Ala658 de endoglina también da lugar a una proteína dimerica en superficie, los resultados sugieren que las cisteínas contenidas en el fragmento Cys330-Cys412 están implicados en la formación de puentes disulfuro. La infección con formas recombinantes de *Vaccinia* que codifican para una mutación en HHT1 no afectan a la expresión de endoglina normal, ni tampoco a la asociación de la forma soluble recombinante con la endoglina situada en el dominio transmembrana. Estos resultados apoyan el modelo de haploinsuficiencia para explicar la HHT1.

Regulación transcripcional de genes endoteliales

1. Cooperación transcripcional entre Sp1 y TGF- β en el promotor de endoglina. Endoglina es un componente del complejo receptor de TGF- β que se expresa en células endoteliales, esta implicado en la morfogénesis y remodelación cardiovascular. Endoglina es el gen mutado en la telangiectasia hereditaria hemorrágica tipo 1 (HHT1) que se manifiesta como una enfermedad autosómica dominante. Puesto que se ha demostrado que la haploinsuficiencia es el mecanismo responsable de la enfermedad, entender la regulación de la expresión de endoglina es un paso crucial hacia la corrección de la misma. En nuestro grupo hemos identificado un sitio funcional Sp1 a -37 que es crítico para la actividad basal del promotor de endoglina. Además, este sitio está implicado en la estimulación de la producción de endoglina por TGF- β que viene mediada por Smad3. La unión de Sp1 y Smad 3 al promotor de endoglina, en su región más proximal, -50/-29, promueve una cooperación sinérgica en la transcripción. El mecanismo molecular de la cooperación entre ambos factores consiste en una interacción física directa entre Sp1, y Smad3.

2. Cooperación transcripcional entre Hipoxia y TGF- β en el promotor de VEGF. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) constituye uno de los estímulos primordiales en el desencadenamiento de la angiogénesis. En nuestro grupo, se ha demostrado una cooperación funcional entre la hipoxia y el factor de crecimiento tumoral (TGF- β) en la inducción de la transcripción de VEGF. Esta cooperación se

endoglin, supporting a haploinsufficiency model for HHT1.

Transcriptional regulation of endothelial genes.

1. *Transcriptional cooperation Sp1/TGF- β in endoglin promoter.* Endoglin is a transmembrane protein member of the TGF- β receptor complex. It is expressed in endothelial cells and involved in cardiovascular morphogenesis and vascular remodelling. Endoglin is the mutated gene in the Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, type 1 (HHT1), expressed as an autosomal dominant disease. As haploinsufficiency is the underlying mechanism responsible for the deficiency, understanding endoglin regulation is a step forward to correct the disease. A Sp1 functional site at -37 of endoglin promoter has been identified as crucial for the basal transcription activity of endoglin. Moreover, this site is involved in TGF- β induction of endoglin synthesis through the Smad 3 pathway. Binding of Sp1 and Smad 3 to the -50/-29 region of endoglin promoter gives rise to a synergistic cooperation between both factors, mediated through a direct physical interaction.

2. *Transcriptional cooperation between Hypoxia and TGF- β in VEGF promoter.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the primordial stimulus involved in angiogenesis. A functional cooperation between hypoxia and TGF- β in the VEGF promoter has been described. This cooperation has been mapped within -1006/-954 region. TGF- β signalling is mediated by members of the Smad family. It has been shown that Smad 3 is the functional factor in the VEGF promoter. Hypoxia triggers the formation of a complex transcriptionally active, HIF-1, whose nuclear translocation depends on the oxygen levels. We have shown that the optimal induction of VEGF promoter is achieved in the presence of Smad3. Coimmunoprecipitation experiments between Smad3 and HIF-1 reveal a direct physical interaction between both factors. This physical interaction leads to a functional synergy between TGF- β /Hypoxia stimuli, which is regulating VEGF expression at the transcriptional level.

3. *NF- κ B regulation, mediating inflammatory stimulus in PECAM-1 promoter.* PECAM-1 is a transmembrane receptor, involved in cell adhesion, which is expressed in platelets, monocytes, neutrophils, a subgroup of T lymphocytes and in endothelial cells. PECAM-1 takes part in the leukocyte trans migratory processes. A NF- κ B functional site has been identified in the regulation of PECAM-1 expression by inflammatory stimuli.

ha localizado en la región -1006/-954 del promotor. La señalización por TGF- β viene mediada por los miembros de la familia Smads, demostrándose que en VEGF Smad 3 es el factor funcional. El estímulo de hipoxia, a nivel funcional, viene regulado por la formación de un complejo transcripcional HIF-1, cuya translocación al núcleo depende de los niveles de oxígeno. Hemos demostrado que la inducción óptima de VEGF en condiciones de hipoxia se obtiene en presencia de Smad3. Experimentos de co-inmunoprecipitación entre Smad3 y HIF-1 revelan que hay una interacción física entre ambos factores que funcionalmente se traduce en una sinergia, TGF- β /Hipoxia, la cual regula la expresión de VEGF a nivel transcripcional.

3. Regulación vía NF- κ B por estímulos inflamatorios en el promotor de PECAM-1. PECAM-1, es un receptor transmembranal implicado en adhesión, que se expresa en plaquetas, monocitos, neutrófilos, subpoblaciones de células T y en células endoteliales, participando en los procesos de trans migración leucocitaria. En nuestro grupo se ha identificado un sitio funcional, NF- κ B, implicado en la regulación de la expresión de PECAM-1, por estímulos inflamatorios. En células mieloides encontramos que la expresión de PECAM-1 está regulada por factores moduladores de NF- κ B, como TNF α , PMA y PDTC. Los experimentos demuestran que esta regulación es transcripcional y depende de la unión de los complejos p65/p50 y p50/p50 de la familia κ B, al sitio consenso NF- κ B situado a +110/+120 de PECAM-1.

Vías de señalización intracelular y factores de transcripción implicados en la diferenciación y maduración de células dendríticas humanas.

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno especializadas, que actúan como "centinelas" del sistema inmune y son esenciales para el inicio de la respuesta inmune primaria. La singularidad de las células dendríticas radica en su capacidad de estimular linfocitos T vírgenes. Además, las células dendríticas juegan un papel esencial en la polarización de los linfocitos con los que interactúan, controlando el tipo de respuesta frente a cualquier elemento extraño (patógeno, trasplante, tumor): respuesta inmune celular, humoral o tolerancia. Nuestro laboratorio está llevando a cabo la disección de los mecanismos de señalización y

In myeloid cells, PECAM-1 expression is regulated by NF- κ B modulators: TNF- α , PMA and PDTC. Experiments show that the regulation is at the level of transcription, and is dependent on the p65 and p50 complexes binding to the NF- κ B site placed at +110/+120 in the PECAM-1 promoter.

Pathways of intracellular signalling and transcription factors involved in differentiation and maturation of human dendritic cells

Dendritic cells are specialized antigen presenting cells whose functions are critical for the initiation of primary immune responses. Dendritic cells are unique in their capacity to stimulate naive T lymphocytes, and also play a key role in polarizing T lymphocytes, thus controlling the type of immune response triggered upon contact with any foreign agent (cellular, humoral or tolerance). Our laboratory is analyzing the signaling and transcriptional mechanisms involved in the differentiation and functional maturation of dendritic cells, as well as in the acquisition of their polarizing functions. These studies will pave the way for the development of methods to manipulate the immune system in pathological situations where its activity should be either enhanced (vaccines, anti-tumor immunotherapy) or abrogated (autoimmune diseases, transplant rejection).

Relationship between the expression of adhesion molecules and the proliferation/differentiation state: effects of extracellular matrix and proto-oncogenes

Leukocyte functions during immune and inflammatory responses and the metastatic capacity of leukemia and lymphoma cells are dependent on adhesion to, and migration through, the endothelial layer which is mediated by the CD11a,b,c/CD18 leukocyte integrins. Our studies are focussed on the identification of the regulatory sequences and DNA elements which direct the tissue-specific and developmentally-regulated transcription of the CD11a and CD11c integrin genes. So far, we have demonstrated the involvement of the AP-1, C/EBP and AML transcription factor families, as well as a relevant role for the proto-oncogenes c-Myc and PU.1. In addition, and given the role of extracellular matrix in cellular proliferation and differentiation, we are searching for extracellular matrix-responsive elements within the regulatory regions of the above mentioned genes.

transcripción implicados en la diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica, así como durante la maduración de células dendríticas y la adquisición de sus funciones polarizadoras. Nuestros resultados pueden contribuir al desarrollo y la optimización de las técnicas de manipulación del sistema inmune en casos en los que su actividad haya de ser inducida/potenciada (desarrollo de vacunas, inmunoterapia anti-tumoral) o reprimida (enfermedades autoinmunes, trasplantes).

Relación entre la expresión de moléculas de adhesión y el estado de proliferación/diferenciación celular: efectos de la matriz extracelular y proto-oncogenes.

Las funciones leucocitarias durante las respuestas inmune e inflamatoria y la capacidad metastática de leucemias y linfomas son absolutamente dependientes de mecanismos de adhesión y migración transendotelial mediados por las integrinas CD11a,b,c/CD18. Nuestros estudios están centrados en la identificación de las secuencias reguladoras y los factores nucleares implicados en la transcripción leucocito-específica y desarrollo-dependiente de los genes que codifican las integrinas CD11a y CD11c. Hasta el momento, hemos demostrado la participación de los factores AP-1, C/EBP y AML en la transcripción de ambos genes, así como la participación de proto-oncogenes como c-Myc y PU.1. Por otra parte, y dado el papel relevante de la matriz extracelular como factor de crecimiento y diferenciación celular, pretendemos determinar los elementos de respuesta a la matriz extracelular en las regiones reguladoras de los mencionados genes.

Organismos financiadores/ Funding Agencies

- CAM, 08.1/0022/1997 (1997-1999)
- CICYT, SAF97-0034. (1997-2000)
- MICYT, SAF98/0068. (1998-2001)
- CAM, 08.4/0020.1/99 (2000-2000)
- CAM, 08.2/0035.1/99. (2000-2000)
- MICYT, SAF2000-0132 (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Ainhoa Letamendia Urraca.** Papel de endoglin en las respuestas celulares a TGF-beta. Universidad Complutense, Madrid. 1999. Director: Carmelo Bernabéu Quirante
- **Santiago Botella Cubells.** Estudio de las proteínas de stress en pacientes de UCI, tras anestesia y en procesos tumorales. Universidad Complutense de Madrid, 1999. Directora: Luisa-María Botella Cubells

Patentes/Patents

- Letarte, M., Massagué, J., Bernabéu, C. y Cheifetz, S. (1999). Recombinant production of soluble TGF-B-binding endoglin polypeptides. Número de Patente: 6.015.693. Oficina de Patentes de Estados Unidos.

Publicaciones/Publications**Artículos en Revistas/Journal Articles**

- Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendia, A., Pérez-Alvarez, M.J., Langa, C., López, L.A., Fabra, A., García-Pardo, A., Vera, S., Letarte, M., and Bernabéu, C. (1999). Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 614-623
- Raab, U., Lastres, P., Arévalo, M. A., Lopez-Novoa, J. M., Cabañas, C., de la Rosa, E. J., and Bernabéu, C. (1999). Endoglin is expressed in the chicken vasculature and is involved in angiogenesis¹ *FEBS Lett.* **459**, 249-254.
- Raab, U., Velasco, B., Lastres, P., Letamendia, A., Calés, C., Langa, C., Tapia, E., López-Bote, J. P., Páez, E., and Bernabéu, C. (1999). Expression of normal and truncated forms of human endoglin. *Biochem. J.* **339**, 579-588.
- Abdalla, S. A., Pece-Barbara, N., Vera, S., Tapia, E., Páez, E., Bernabéu, C., and Letarte, M. (2000) Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1227-1237.
- Botella, L. M., Puig-Kröger, A., Almendro, N., Sánchez-Elsner, T., Muñoz, E., Corbí, A., and Bernabéu, C. (2000). Identification of a functional NF- κ B site in the platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter. *J. Immunol.* **164**, 1372-1378.
- Conley, B. A., Smith, J. D., Guerrero-Esteo, M., Bernabéu, C., and Vary, C. P. H. (2000). Endoglin a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **153**, 323-335.
- Corbí, A. L., Jensen, U. B., and Watt, F. (2000). C/EBP α and C/EBP β regulate the expression of the collagen and fibronectin receptors in keratinocytes *FEBS Lett.* **474**, 201-207
- Li, C., Hampson, I. N., Hampson, L., Bernabéu, C., and Kumar, S. (2000). CD105 antagonizes the inhibitory signalling of transforming growth factor β_1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* **14**, 55-64.
- López-Rodríguez, C., Delgado, M. D., Puig-Kröger, A., Nueda, A., Muñoz, E., León, J., Bernabéu, C., and Corbí, A. L. (2000). c-Myc inhibits CD11a and CD11c leukocyte integrin promoters. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2465-2471.
- Puig-Kröger, A., López-Rodríguez, C., Relloso, M., Sanchez-Elsner, T., Nueda, A., Muñoz, E., Bernabéu, C., and Corbí, A. L. (2000). Polyomavirus Enhancer Binding Protein 2/ Core Binding Factor/ Acute Myeloid Leukemia factors contribute to the cell type-specific activity of the CD11a integrin gene promoter. *J. Biol. Chem.* **275**, 28507-28512.
- Puig-Kröger, A., Sanz-Rodríguez, F., Longo, N., Sánchez-Mateos, P., Botella, L.M., Teixido, J., Bernabéu, C., and Corbí, A. L. (2000). Maturation-Dependent Expression and Function of the CD49d Integrin on Monocyte-Derived Human Dendritic Cells. *J. Immunol.* **165**, 4338-4345.

Terapia del Cáncer: Activación de los Mecanismos de Apoptosis

Cancer Therapy: Triggering of Apoptosis in Cancer Cells

AUGUSTO SILVA

Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ICIAR LÁZARO TRUEBA

LAURA SANZ ALCOVER (Hasta VII-1999)
B. Postdoctorales / Postdoctoral fellows

Carmen Arias López (Desde IX-1999)

ANA GUTIÉRREZ DEL ARROYO VALENCIANO (Hasta VII-2000)

JORGE GAMONAL ARAVENA

OLGA JORGE TORRES (Hasta I-2000)
B. Predoctorales / Graduate Students

JUANA MARÍA LÓPEZ VERA

Personal Técnico / Technician

Palabras clave: p53, cancer, Leucemia Linfoide Crónica, apoptosis, periodontitis

Keywords: p53, cancer, Chronic Lymphocytic Leukemia, apoptosis, periodontitis

Mecanismos de regulación de la apoptosis dependiente de p53 en la progresión tumoral

Regulatory mechanisms involved in p53 dependent apoptosis during tumor progression

El proyecto se ocupa fundamentalmente del estudio de las alteraciones funcionales derivadas de la presencia de mutaciones en la proteína supresora de tumores p53. Inicialmente se valoró la respuesta al daño mediada por p53 en dos líneas de carcinoma mamario que albergan las mutaciones R280K y L194F. Los resultados obtenidos han demostrado defectos funcionales diferentes en los dos tumores en su capacidad de parada del ciclo celular, actividad transactivadora e inducción de muerte celular. Ambas mutaciones se localizan en el dominio de unión al DNA, donde se concentran el 96% de las mutaciones de p53. La mutación R280K se considera una mutación funcional que afecta directamente a un aminoácido implicado en la interacción proteína-ADN. La mutación L194F, sin embargo, se considera estructural pues afecta la

The project deals basically with the study of functional disabilities derived from the presence of mutations in the tumour suppressor protein p53. Initially, the response to DNA damage was evaluated in two breast carcinoma cell lines harbouring mutations R280K and L194F respectively. Results obtained have demonstrated differing functional defects in both tumours regarding their ability to induce cell cycle arrest, their transactivation activity and cell death induction. Both mutations are located in the DNA-binding domain, where 96% of p53 mutations are concentrated. Mutation R280K is considered as an example of a functional mutation, directly affecting an aminoacid implicated in protein-DNA interaction. However, mutation L194F is a structural mutation because it affects the stability and overall folding of the domain. Subsequently, and in order to specifically

estabilidad y plegamiento del dominio. Posteriormente, y para analizar específicamente los mecanismos dependientes de p53 se estableció un modelo experimental transfectando dos líneas celulares p53 -/- (SAOS-2 y H1299) con plásmidos generados por mutagénesis dirigida que codifican las dos mutaciones en estudio.

En este sistema se ha valorado la capacidad de transactivación comparativa entre la p53 salvaje y las proteínas mutantes realizando transfecciones transitorias con plásmidos reporteros que contienen regiones promotoras de diversos genes diana de p53. Asimismo se ha estudiado la actividad transcripcional simulando estadios precoces del proceso tumoral, en los que coexisten proteínas p53 salvajes y mutantes, mediante co-transfecciones de ambos plásmidos y análisis de la regulación transcripcional y de la apoptosis.

La capacidad de unión de las proteínas a elementos de respuesta de p53 se estudió por ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) y ensayos de unión de proteínas a oligonucleótidos específicos marcados con biotina, purificación de DNA por afinidad (DNAP) y detección de la p53 unida por "western blot". Para ambas técnicas se utilizaron extractos nucleares de células transfectadas y proteínas traducidas in vitro.

El estudio de expresión génica se ha realizado por "northern blot" y análisis cuantitativo por RT-PCR a tiempo real a partir de las células transfectadas con p53 salvaje y mutantes para detectar la inducción de mensajeros específicos. Actualmente nuestros objetivos se dirigen a la búsqueda de nuevos elementos implicados en la funcionalidad de p53 mutantes mediante técnicas genómicas (arrays) y proteómicas (geles de 2D de alta resolución).

Análisis biológico, molecular e influencia pronóstica de las alteraciones del gen p53 en la Leucemia Linfóide Crónica de células B (B-CLL)

Las alteraciones funcionales de la proteína p53 se asocian con una mayor frecuencia de padecer cáncer. p53 es además una proteína muy comprometida con la transformación neoplásica ya que está alterada en más de un 50% de tumores humanos y asociada a un peor pronóstico. La leucemia linfática crónica (LLC-B) es el síndrome linfoproliferativo más frecuente del adulto. El curso clínico de esta enfermedad suele

analyse p53 dependent mechanisms, an experimental system was established by transfecting two p53-/- cell lines (SAOS-2 and H1299) with plasmids generated by site-directed mutagenesis coding both mutations under study.

Comparative transactivation activity between wild type and mutant proteins has been evaluated in this system performing transient transfections with reporter plasmids that contain promoter regions of a variety of p53 target genes. Similarly, and in an attempt to mimic initial stages of tumorigenesis, in which both wild type and mutant proteins coexist, transcriptional activity and apoptosis induction have been studied following cotransfection with both types of plasmids.

The binding ability of the different proteins to DNA p53 response elements was analysed by EMSA and by binding assays of protein and biotin labelled specific oligonucleotides, DNA affinity precipitation (DNAP) and p53 detection by Western Blot. Nuclear extracts from transfected cells and in vitro translated proteins were used for both techniques.

The study of gene expression has been performed by Northern Blot and quantitative RT-PCR with wild type and mutant p53 transfected cells in order to evaluate mRNA induction of specific p53 regulated genes. At present, our work is aimed towards the identification of novel elements involved in the function of p53 mutants by means of genomic (microarrays) and proteomic (high resolution 2D electrophoresis) techniques.

Analysis and prognostic effect of p53 modification in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL)

Functional alteration in the p53 molecule is associated with an increase in cancer rate. In fact, p53 knockout mice are cancer-prone. Furthermore, p53 is highly implicated with carcinogenesis where most of the 50% of human cancer present some type of p53 mutations, associated with poor prognosis. B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is the most frequent lymphoproliferative disorder in adults. Although most of the cases have a good prognosis, some patients (20-30%) show a more aggressive clinical evolution, with cytogenetic alterations where p53 is frequently involved. Therefore, the detection of p53 alterations might represent a marker of tumor progression and worse prognosis. To analyze how modification in p53 could be involved in the evolution of B-CLL, we plan to investigate: 1) Sequential molecular cytogenetic analysis of chromosome 17p (p53 maps to

ser asintomática o leve al inicio, sin embargo, existe un grupo de pacientes afectos de LLC-B (20-30%) cuya enfermedad muestra una evolución clínica rápidamente progresiva y que esta asociada a alteraciones citogenéticas en la que puede estar implicada la p53. Así, se postula que las alteraciones de p53 son un marcador de progresión tumoral en la LLC-B y por consiguiente asociado a un peor pronóstico en la evolución de la enfermedad.

Con objeto de analizar como las alteraciones de p53 pueden influir en la evolución de la LLC-B, queremos estudiar: 1) análisis citogenético molecular de las alteraciones en el cromosoma 17p (p53 mapea en 17p13.1) y luego la localización a nivel molecular de la mutación de p53, tanto al diagnóstico como durante la evolución de la enfermedad. 2) Estudio de la pérdida de la heterocigosidad alélica (LOH) mediante el análisis de microsatélites localizados en 17p. 3) Análisis de la proteína p53 mediante WB y citometría. 4). Comportamiento funcional de p53 en respuesta a tratamientos farmacológicos, lo que nos permitirá una mejor evaluación de la respuesta de clones/subclones celulares afectos de deleciones/mutaciones de p53 a diferentes fármacos. 5). Seguimiento de la evolución clínica en pacientes con alteraciones estructurales del cromosoma 17 y/o alteraciones moleculares del gen p53. Nuestros estudios previos sobre el efecto de las mutaciones sobre la actividad funcional de la p53 nos ha permitido definir una "zona" dentro de la región al DNA, que segregan actividades biológicas de la p53, como la capacidad de detener el ciclo celular, de transactivar genes y de inducir apoptosis. La localización precisa de estos mutantes de p53 en la LLC-B nos permitirá un mejor conocimiento sobre los mecanismos implicados en la progresión de esta enfermedad.

Estudio inmunológico y molecular de los factores que interviene en la periodontitis crónica

La periodontitis crónica se caracteriza por la inflamación de las estructuras periodontales, produciéndose la destrucción del tejido conectivo de inserción periodontal y la posterior pérdida del diente, cuyo agente etiológico es la placa bacteriana acumulada entre el diente y el tejido gingival. La activación de la respuesta inmune trae como consecuencia la secreción de citoquinas que provocan la acumulación de células de la respuesta inmune, responsables de la activación de

17p13.1) and further localization of p53 mutations. 2) Loss of heterogeneity (LOH) at chromosome 17p and fluorescence in situ hybridization for the detection of gross p53 abnormalities. 3) Identification of p53 protein by Western blot and flow cytometry, 4) Functional response of p53 under pharmacological treatments, which might suggest the therapeutic choice to obtain an improved prognosis, and 5) Evaluation of clinical follow up. Our previous data on the effect of p53 mutations on the functionality of the molecule suggest the presence of "areas" inside the DNA binding domain which cosegregate with some of the biological activities associated with p53 such as cell cycle arrest, gene transactivation and apoptosis. The precise localization of these possible p53 mutations present in B-CLL cells will allow us a better understanding of the mechanism of disease progression.

Molecular and Immunological analysis of key factors involved in chronic periodontitis

The adult periodontal disease is characterized by the inflammation of the periodontal tissues, and the destruction of the connective tissue with attachment loss of the tooth, in which the etiologic agent is the bacterial plaque accumulated between the tooth and the gingival tissue.

Finally, adult periodontal disease is characterized by the inflammation of the periodontal tissues, with destruction of the connective tissue with attachment loss of the tooth, which etiologic agent is the bacterial plaque accumulated between the tooth and the gingival tissue. The activation of the immune response results in the secretion of cytokines and the accumulation of immune response cells, responsible of the activation of a tissue destruction process. Epidemiologic studies suggest that the progression of periodontitis is episodic, with periods of destruction of the periodontal tissue, followed by episodes of resting activity without evidence of destruction and, even, with regeneration of the periodontal tissue. The presence of IL-12, and detection of chemokine receptors like CCR3 and CCR5 are indicators of type Th1 or Th2. The responses determination of cytokines (IL-12)/chemokines (IL-8, MCP-1), cell populations (Th1, Th2, B, PMN, macrophages) and the presence of apoptotic cells, would allow us to define the molecular mechanisms of destruction associated with the progression of the periodontal disease. The identification of markers of progression could help early diagnosis and provide new treatments, being this one of the objectives of the pre-

procesos de destrucción del tejido. Estudios epidemiológicos sugieren que la progresión de la periodontitis es episódica, con períodos de destrucción del tejido periodontal, seguido de episodios de quietud sin evidencias de destrucción e incluso con regeneración del tejido periodontal perdido. La presencia de IL-12, y la determinación de receptores de quimioquinas tales como CCR3 y CCR5 son indicadores de una respuesta del tipo Th1 o Th2. La determinación de citoquinas (IL-12)/quimioquinas (IL-8, MCP-1), de poblaciones celulares (células Th1, Th2, B, PMN, macrófagos) y la presencia de muerte celular por apoptosis, una vez que se produce un período de destrucción en la enfermedad, determinada por un control clínico longitudinal, y también después de eliminada la infección a través del tratamiento de la misma, nos permite determinar los mecanismos moleculares de destrucción asociados con la progresión de la enfermedad periodontal. La identificación de marcadores de progresión facilitaría el diagnóstico y el proponer nuevas modalidades de tratamiento. Para ello estamos identificando reguladores solubles de la inflamación en el fluido gingival crevicular (FGC), los distintos componentes del infiltrado inflamatorio, y su papel en la progresión de la enfermedad.

Finalmente, la progresión de la enfermedad periodontal se caracteriza por la destrucción episódica de los tejidos de soporte dentarios. Este fenómeno implica la reabsorción de componentes de la matriz extracelular (MEC). La identificación de marcadores de progresión podría facilitar el diagnóstico de la periodontitis y proponer nuevas modalidades de tratamiento, siendo este uno de los objetivos del presente proyecto. Para ello buscaremos tanto la identificación de MMPs en el fluido gingival crevicular (FGC), y en los distintos componentes del infiltrado inflamatorio que estén asociados a la secreción de las MMPs y su papel en la progresión de la enfermedad periodontal en un diseño longitudinal realizado en colaboración con el Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial, Sección de Periodoncia de la Facultad de Odontología, UCM.

Plasticidad de las células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea adulta para transdiferenciarse en células neuronales

Las células madre (Stem cells) se definen como células

sent project. We will identify soluble regulators of in the gingival crevicular fluid (GCF), the different components of the inflammatory infiltrate, and their role in the progression of the periodontal disease.

Progression of the periodontal disease is characterized by episodic destruction of the supporting tissues of the teeth. This implies the absorption of the components of the extracellular matrix. Having detected a period of destruction with a longitudinal study, and after eliminating the infection through the treatment, we are going now to determine the cytokines/chemokines, the cell populations, the presence of apoptotic cells and levels of MMPs, which would allow us to define the molecular mechanisms of destruction associated with the progression of the periodontal disease.

The identification of markers of progression could facilitate the diagnosis and provide new treatments, being this one of the objectives of the present project.

We will identify the MMPs in the gingival crevicular fluid (FGC) and in the different components of the inflammatory infiltrate, associated with the secretion of the MMPs, and their role in the progression of the periodontal disease.

This study carried out in collaboration with the Department of Medicine and Bucofacial Surgery, Section of Periodoncia of the Faculty of Odontology, UCM.

Hematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into oligodendrocyte progenitors and ependymocytes in the neonatal mouse brain

Stem cells are selfrenewal, pluripotent cells that in adult life proliferate by characteristic asymmetric divisions, in which one daughter is committed to differentiation and the other remains as a stem cell. Stem cells are also known by their ability to differentiate into various cell types under heterotopic environmental influences. In the present work we explore the potentiality of hematopoietic bone marrow cells to transdifferentiate as oligodendrocyte progenitors under physiological active myelinating conditions. We present evidence of oligodendrocyte generation from adult hematopoietic progenitor cells (CD117+) in vivo, after intracerebral transplantation in the neonatal mouse brain. Moreover, bone marrow hematopoietic progenitors can be integrated in the ependymal layer, differentiate into neural precursors and generate neurons, in addition to oligodendrocyte proge-

pluripotentes, que se autoregeneran y que durante la vida adulta de los individuos proliferan mediante divisiones asimétricas características, en el que una célula hija se diferencia mientras que la otra célula se mantiene como célula pluripotente. Las células madre son también conocidas por su capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares bajo condiciones e influencia de factores micro-ambientales especiales y de diferenciación. Nuestro grupo ha estado colaborando con el Dr. Salvador Martínez, (Instituto de Neurociencias, U. de Miguel Hernandez de Alicante) explorando el potencial de precursores hematopoyéticos para transdiferenciarse en progenitores de oligodendrocitos y neuronas bajo condiciones fisiológicas de mielinación activa. Hemos demostrado la generación de oligodendrocitos a partir de células progenitoras hematopoyéticas de ratones adultos (CD117+) in vivo, tras trasplante intracerebral en el cerebro de ratones neonatales. Además, los progenitores de médula ósea hematopoyéticos pueden integrarse en la capa de células ependimales y diferenciarse hacia neuronas, además de en progenitores de células oligodendrocitos. Estos datos demuestran la posibilidad de que la transdiferenciación hematopoyética de células madre de individuos adultos pueden ser utilizados en trasplantes de daños neurales irreversibles, con enormes expectativas terapéuticas.

nitors. These results strongly suggest the possibility of bone marrow cell transdifferentiation, from hematopoietic to neural stem cells.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- PN I+D, SAF1997-064-C03 (1997-2000)
- CAM, 08/0012 (1997-2000)
- CAM, 029/97 (1998-1999)
- CAM, 029/99 (1998-2000)
- PN I+D, SAF2000-118-C03 (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Ana Gutierrez del Arroyo Valenciano.** Aspectos funcionales de la proteína p53 en la regulación de la apoptosis inducida por agentes genotóxicos. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Biológicas. (2000). Director: Augusto Silva.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- De la Fuente, M.T., Casanova, B., García-Gila, M., Silva, A., and García-Pardo A. (1999). Fibronectin interaction with 4b1 integrin prevents apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia* 13, 266-274.
- Gamonal, J and, Silva, A. (1999). Interleuquina 1 e interleukina 8 en pacientes adultos con periodontitis destructiva: efectos del tratamiento periodontal. *Av. Periodon Implantol.* 11, 183-189.
- Gamonal, J, Bascones, A., and Silva, A. (1999). Papel de la apoptosis en la destrucción tisular producida en la periodontitis. *Av. Periodon. Implantol.* 11, 45-50.
- Gamonal, J., Bascones A., and, Silva, A. (1999). Las quimioquinas en la patogenesis de la periodontitis. *Av. Periodon. Implantol.* 11, 889-893.
- Gamonal, J., Bascones, A., Jorge, O., and, Silva, A. (2000). The presence of RANTES in Gingival Crevicular Fluid of adult patients with destructive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 27, 675-680.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge A., and Silva, A. (2000). Levels of Interleukin-1, -8, -10 and RANTES in Gingival Crevicular Fluid and Cell Populations in Adult Patients with Destructive Periodontitis and the Effect of Periodontal Treatment. *J. Periodontol.* 71, 1535-1545.
- Gutiérrez del Arroyo, A., Gil, C., de Marco, M.C., Layunta, I., and Silva, A. (2000). Up-regulation of CD95 (APO-1/Fas) by X-irradiation is p53 dependent and regulated by interleukin 3. *Oncogene.* 19, 3647-3655.
- Palacios, C., Gutiérrez del Arroyo, A., Silva, A., and Collins, M. (2000). The role of p53 in death of IL-3 dependent cells in response to cytotoxic drugs. *Oncogene* 19, 3556-3559.

Mecanismos Celulares de Acción de Taxoides Fluorescentes

Cellular Mechanisms of Fluorescent Taxoid Action

ISABEL BARASOAIN BLASCO
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigadora de Carrera / Staff Scientist

MIGUEL ABAL POSADA (HASTA VII-1999)
B. Predoctoral / Graduate Student



Figura: Mitosis anormales en células humanas de carcinoma de mama MCF-7 inducidas por Taxol fluoresceinado (150 nM). Los cromosomas (azul) están desplazados a posiciones periféricas debido a la formación de husos múltiples, donde las microtúbulos diana han sido visualizados con el taxoide fluorescente (verde). Este compuesto induce la muerte celular.

Figure: Abnormal mitoses in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by fluoresceinated Taxol (150 nM). The chromosomes (blue) are displaced to peripheral positions due to the formation of multiple spindle poles, where target microtubules have been imaged with the fluorescent taxoid (green). This compound will induce cell death.

Palabras clave: Taxol, microtúbulos, centrosomas, células tumorales.

Dianas subcelulares de taxoides fluorescentes que inducen muerte celular

Taxol (paclitaxel) es un potente agente antitumoral que induce el ensamblaje *in vitro* de microtúbulos, inhibe la dinámica normal de los microtúbulos celulares y la división celular desencadenando la muerte celular por diversas vías. Aunque se considera que Taxol se une a los microtúbulos celulares, las dianas subcelulares de la unión citotóxica de Taxol no habían sido visualizados directamente. Los microtúbulos celulares presentan una alta concentración local de sitios de unión para taxoides citotóxicos o para hipotéticos reguladores endógenos. Varios compuestos de diversos orígenes estabilizan los microtúbulos y bloquean la división celular de forma similar a Taxol. Empleando un taxoide fluorescente (Flutax) que interacciona reversiblemente con los sitios de unión de Taxol en los microtúbulos e induce efectos celulares similares a Taxol hemos investigado la localización subcelular de los sitios de unión de Taxol. La unión específica de Flutax a una fracción de los sitios disponibles de unión inhibe efectivamente la división de células tumorales en cultivo en G2/M y dispara la muerte por apoptosis. Los centrosomas con algún microtúbulo asociado en células en interfase, y los microtúbulos polares del huso en células mitóticas son los sitios de unión reversible observados directamente en células U937 intactas tratadas con concentraciones citotóxicas de taxoide fluorescente, en vez de marcar uniformemente el citoesqueleto microtubular. Las lesiones del citoesqueleto inducidas y visualizadas con Flutax consisten en haces de microtúbulos y mitosis anormales, incluyendo husos monopolares y husos múltiples muy fluorescentes. Los husos múltiples y los husos monopolares marcan la leucemia U937 y las células de carcinoma de ovario OVCAR-3 en su camino a apoptosis (así como las K562, HeLa y MCF-7). Dependiendo del tratamiento con Flutax, las células OVCAR-3 mueren desde la mitosis anormal o de una interfase subsiguiente con contenido doble de cromatina y núcleos lobulados (micronúcleos), indicando un fallo en la separación de los centrosomas. Los centrosomas fragmentados pueden ser observados en células 3T3.A31 tratadas con Flutax que desarrollan micronúcleos pero que son

Keywords: Taxol, microtubules, centrosomes, tumour cells

Subcellular targets of a fluorescent taxoid inducing cell death

Taxol (paclitaxel) is a potent antitumour agent that induces the *in vitro* assembly of microtubules, inhibits the normal cellular microtubule dynamics and cell division, inducing cell death by diverse pathways. Although it is considered that Taxol binds to cellular microtubules the subcellular targets of Taxol cytotoxic binding have not been directly visualized. Cellular microtubules offer a very large local concentration of binding sites for cytotoxic taxoids or for hypothetical endogenous regulators. Several compounds from diverse sources stabilize microtubules and arrest cell division similarly to Taxol. We have investigated the subcellular location of the Taxol binding sites, employing a fluorescent taxoid (Flutax) which reversibly interacts with the Taxol binding sites of microtubules and induces cellular effects similar to Taxol. The specific binding of Flutax to a fraction of the available cellular binding sites effectively inhibits division of cultured human tumour cells at G2/M, and triggers apoptotic death. The loci of reversible binding, directly imaged in intact U937 cells treated with cytotoxic doses of fluorescent taxoid are the centrosomes, with a few associated microtubules in interphase cells, and the spindle pole microtubules in mitotic cells, instead of uniformly labelling the microtubule cytoskeleton. Cytoskeletal lesions induced and visualized with Flutax consist of microtubule bundles and abnormal mitoses, including monopolar spindles and highly fluorescent multipolar spindles. The multiple asters and monopolar spindles mark arrested U937 leukaemia and OVCAR-3 ovarian carcinoma cells on their path to apoptosis (as well as K562, HeLa and MCF-7 cells). Depending on the Flutax treatment, OVCAR-3 cells died from abnormal mitosis or from a subsequent interphase with double chromatin content and lobulated nuclei (micronuclei), indicating impairment of centrosome separation. Fragmented centrosomes could be observed in Flutax-treated non-transformed 3T3.A31 cells, which developed micronuclei but were resistant to apoptosis. These results strongly suggest that centrosomal impairment by taxoid binding during interphase, in addition to the suppression of the kinetochore microtubule dynamics in the mitotic spindle, is a primary cause of cell cycle deregulation and cell death (Abal et al., y Barasoain, I., *Cell. Motil. Cytoskel.* 49, 1-15, 2001).

resistentes a apoptosis. Los resultados sugieren que el daño centrosomal por la unión de taxoide durante la interfase, así como la supresión de la dinámica de los microtúbulos del cinetocoro en el huso mitótico, es una causa primaria de la desregulación del ciclo y de la muerte celular (Abal et al., y Barasoain, I., *Cell Motil. Cytoskel.* 49, 1-15, 2001).

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB95-0116 (1996-1999)
- DGICYT, PB95-0078-C02-01 (1996-1999)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Miguel Abal Posada.** Localización de las dianas celulares de unión de Taxol en los centrosomas y microtúbulos con taxoides fluorescentes citotóxicos. Universidad Complutense de Madrid. 1999. Directora: I. Barasoain.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Ahrazem, O., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., Barasoain, I., Bernabé, M., and Leal, J.A. (1999). Structural characterization of a cell wall polysaccharide from *Penicillium vermoesenii*: chemotaxonomic application. *Can. J. Bot.* 77, 961-968.
- Domenech, J., Prieto, A., Barasoain, I., Gómez-Miranda, B., Bernabé, M., and Leal, J.A. (1999). Galactomannans from the cell walls of species of *Paecilomyces* sect. *Paecilomyces* and their teleomorphs as immunotaxonomic markers. *Microbiol.* 145, 2789-2796.
- Modig, C., Olsson, P.-E., Barasoain, I., De Inés, C., Andreu, J.M., Roach, M.C., Ludueña, R.F., and Wallin, M. (1999). Identification of beta III- and beta IV tubulin isotypes in cold-adapted microtubules from Atlantic cod (*Gadus morhua*): Antibody mapping and cDNA sequencing. *Cell Motil. Cytoskel.* 42, 315-330.
- Ahrazem, O., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., Barasoain, I., Bernabé, M., and Leal, J.A. (2000). An acid water-soluble cell wall polysaccharide: a chemotaxonomic marker for *Fusarium* and *Gibberella*. *Mycol. Res.* 104, 603-610.
- Gajate, C., Barasoain, I., Andreu, J.M., and Mollinedo, F. (2000). Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4',-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: Protection by Bcl-2 and Bcl-XL and cell cycle arrest. *Cancer Res.* 60, 2651-2659.
- Maya, A.B.S., Del Rey, B., Pelaez Lamamie de Clairac, R., Caballero, E., Barasoain, I., Andreu, J.M., and Medarde, M. (2000). Design, synthesis and cytotoxic activities of naphthyl analogues of Combretastatin A-4. *Borg. Med. Chem.* 6, 2549-2551.

Diferenciación de Linfocitos Humanos

Receptors Driving Human Lymphocyte Development

ANTONIO DE LA HERA

Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ESTHER DIAZ DEL POZO (Desde X-2000)

PALOMA SÁNCHEZ APARICIO

EVA SANZ MERINO

Investigadoras Contratadas / Research Associates

GEMMA FERNÁNDEZ MIGUEL

VERÓNICA PARRILLAS HORCHE (Hasta V-2000)

B. Predoctorales / Graduate Students

Palabras clave: Células T y B, complejo TCR/CD3, suplantador de cadenas ligeras, animales genéticamente modificados, estequiometría

Parte del trabajo aquí referido se realizó en proyectos Coordinados con los Doctores Eva Sanz y Álvarez de Mon (Unidad Asociada I+D al CSIC, Universidad de Alcalá), y colaboraciones con los Doctores Iglesias (Max Plank Institute, Munich) y Alarcón (CBM-CSIC, Madrid). Se realizó una colaboración intramural con al Dra. Clara Goday (CIB-Biología Celular y del Desarrollo), cuyo contenido se recoge en su Memoria.

Los receptores clonales para antígeno de los linfocitos T y B (TCR/CD3 y BCR/CD79) requieren el ensamblaje intracelular de múltiples subunidades antes de que dichos "complejos receptores" sean transportados a la superficie celular, y pueda transducir señales en linfocitos totalmente diferenciados. Las subunidades se agrupan en diversos heterodímeros de proteínas con funciones de reconocimiento de ligando o transducción de señales. Las subunidades de los complejos receptores

Keywords: T and B cells, TCR/CD3 complex, immunoglobulin surrogate receptors, genetically modified mice, stoichiometry

This work was partially done as a Coordinated Project with Drs. Sanz and Álvarez de Mon (Alcalá University-CSIC Joint R&D Unit) and collaborations with Drs. Iglesias (Max Plank Institute, Munich) and Alarcón (CBM-CSIC, Madrid). We also carried out intramural research together with Dr. Goday (Dpt. Of Cellular and developmental Biology- CIB), which is covered in her team report.

Both T and B cell receptors (TCR/CD3 and BCR/CD79) are compound receptors that require the intracellular assembly of complete sets of subunits prior to their transport to the cell surface and become competent for signaling in mature lymphocytes. The subunits are clustered in several heterodimers which contribute to either the ligand recognition or the signal transduction function of the antigen receptor. Antigen receptor subunits regulate lymphocyte development prior to the expression of the complete set of subunits which occurs in an ordered fashion. The occurrence of surrogate subunits for the yet missing allows for

participan en el control del desarrollo de los linfocitos antes de que se haya completado su expresión secuencial. La existencia de genes suplantadores de la función de las cadenas ausentes durante los estadios tempranos de la diferenciación linfocitaria permite la formación de complejos pre-receptores, que son responsables de la señalización en los puntos de control dispuestos entre los estadios de diferenciación de los progenitores de los linfocitos.

Nuestra actividad en este bienio ha estado dirigida a responder tres cuestiones relevantes en dicho área de interés, como: ¿Cuál es la estequiometría de los módulos de reconocimiento de las células T?, ¿Cuál es el orden de expresión de un panel de genes entre los considerados como clave en la diferenciación de una célula productora de anticuerpos?, ¿Tiene el módulo de transducción paralela de señales CD3 $\epsilon\gamma$ funciones distintas del módulo CD3 $\epsilon\delta$?

Nuestros resultados indican que, contrariamente a lo que se pensaba hasta ahora, el receptor que reconoce los complejos antígeno-moléculas de histocompatibilidad en los linfocitos T $\alpha\beta$ posee dos sitios de unión para ligando en vez de uno por complejo TCR/CD3, revisando la estructura cuaternaria del receptor T. Este modelo ha sido amplia y rápidamente aceptado, e incorporado a libro de texto de prestigio internacional.

El trabajo del laboratorio ha contribuido a conocer que CD3 δ no es ni estructuralmente esencial para el transporte de complejos TCR/CD3 a la superficie de las células T, ni funcionalmente redundante con la subunidad homóloga CD3 γ . Este hallazgo previo se complementa el de otros grupos que han demostrado que pueden expresarse complejos TCR/CD3 en células T de animales y personas deficientes en CD3 γ . En este bienio hemos descubierto, utilizando animales genéticamente modificados y anticuerpos específicos de subunidad CD3 caracterizados en nuestro laboratorio del CIB, que existen células T que no expresan CD3 γ o CD3 δ en individuos no inmunodeficientes, caracterizándose dichas células y las isoformas de receptor que expresan.

Se han realizado colaboraciones para establecer la función de receptores de antígeno y coestimuladores en diversas patologías, que han permitido descubrir la regulación de la expresión del coestimulador CD28, con modulación de sus niveles de expresión en la superficie de los linfocitos T durante el curso de la respuesta inmune, lo que contrasta con la noción

the expression of pre-receptors in the surface of lymphocyte progenitors, which act as developmental check points at the transition between the distinct differentiation stages.

We have aimed to address three long-standing questions in the field during the past two years: first, which is the stoichiometry of the recognition module in T cells?, second, which is the order of expression of a panel of genes relevant to the control of immunoglobulin-producing cell generation?, and, third, does the CD3 $\epsilon\gamma$ parallel transduction module have unique functions which are non redundant to those of the CD3 $\epsilon\delta$ module?.

Our results show that TCR that T $\alpha\beta$ cells use to recognize antigen-major histocompatibility complexes bears two binding sites, instead of one, per TCR/CD3 complex, and have revisited the quaternary structure of the T cell receptor. These results have reached a broad diffusion, with quick inclusion into internationally leading reviews and textbooks in Immunology.

Our work has also contributed to uncover that CD3 δ is neither structurally essential for the surface expression of TCR/CD3 complexes in T cells nor functionally redundant with the homologous CD3 δ subunit. Independent work from other laboratories has reached to a similar finding for human and mouse bearing disrupted CD3 γ genes. Using transgenic and knock-out mice and subunit specific antibodies developed by us at the CIB during the past two years, we have contributed to demonstrate that TCR/CD3 receptor complex isoforms occur on the cell surface of cells from animals that have fully functional CD3 γ and CD3 δ genes but bear antigen receptors that are CD3 γ -less or CD3 δ -less antigen receptors.

We have also worked to improve an "in vitro" differentiation system where the coculture of CD34⁺CD38⁻ totipotent hemopoietic cells and bone marrow stromal cells leads to the generation of mature functional B cells, that we contributed in our previous report. It is part of our strategy for the study of the mechanisms that control B cell development, to define discrete B cell differentiation stages, the estimation of their frequency, anatomical location and modifications during the ontogeny of the individual. Modifications introduced now allow for the in vitro expansion of totipotential stem cell candidates. The research efforts in this line have led to the discovery of novel populations of human B-cell progenitors that are under characterization in our laboratory. These efforts are partly funded by a patent technology transfer filled by our group (Spanish Patent Office n° 9602623).

tradicional de una expresión constitutiva estable. Este resultado se enmarca dentro del esfuerzo de desarrollar métodos cuantitativos de análisis de la respuesta inmune y trasladar la información fruto de la investigación fundamental a escenarios aplicados en biomedicina.

Finalmente, hemos introducido mejoras en el sistema de diferenciación *in vitro* de células productoras de anticuerpos a partir de células madre de la sangre totipotenciales CD34⁺CD38⁻ y una línea de estroma de médula osea, desarrolladas previamente por nosotros como parte de nuestra estrategia de estudiar los mecanismos celulares que controlan el desarrollo de los linfocitos B, y caracterizar los estadios de diferenciación B, su frecuencia, distribución anatómica y variación con la edad. Gracias a este trabajo se han podido expandir *in vitro* candidatos a células madre totipotenciales y descubrir nuevas poblaciones de progenitores B no descritas hasta la fecha. Nuestra patente en este tema (Inmunoclón específico para V-preB humano, Oficina Española de Patentes y Marcas Nº 9602623) ha entrado en fase comercial de explotación.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, 08.3/0018/98 (1998-1999)
- CICYT, SAF96-0201-CO2 (1996-1999)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Fernández-Miguel, G., Alarcón, B., Iglesias, A., Bluethmann, H., Alvarez-Mon, M., Sanz, E., and de la Hera, A. (1999). Multivalent structure of an $\alpha\beta$ T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1547-1552.
- Guillén, C., Prieto, A., Alvarez-Escolá, C., Reyes, E., Díaz, D., San Antonio, E., De la Hera, A., Alvarez-Mon, M. (1999). Abnormal functional behavior of peripheral blood mononuclear cells from Hashimoto's disease patients. Immunomodulatory effects of cyclosporin A. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**, 15-39.
- Prieto, A., Reyes, E., Díaz, D., Hernández-Fuentes, M.P., Monserrat, J., Perucha, E., Muñoz, L., Vangioni, R., de la Hera, A., Orfao, A., and Alvarez-Mon, M. (2000). A new method for the simultaneous analysis of growth and death of immunophenotypically defined cells in culture. *Cytometry*, **39**: 56-66.
- Salazar-Fontana, L.I., Sanz, E., de la Hera, A., and Alvarez de Mon, M. (2000). Cell surface CD28 levels define four T cell subsets: abnormal expression in rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol.* **99**, 253-265.

Genética del Complemento *Complement Genetics Laboratory*

SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA

Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

PILAR SÁNCHEZ-CORRAL

Investigadora Contratada / *Research Associate*

OLGA CRIADO GARCÍA

ISABEL FERNAUD-ESPINOSA (Hasta XII-2000)

DAMIAN HEINE SUÑER (Hasta VII-1999)

B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

DANIEL BELTRÁN VALERO DE BERNABÉ (Hasta X-2000)

MIGUEL ANGEL DÍAZ GUILLÉN (Hasta XII-2000)

JORGE ESPARZA GORDILLO (DESDE IX-1999)

M^a ELENA FERNÁNDEZ SÁNCHEZ (DESDE V-2000)

M^a ESTHER GALLARDO PÉREZ

DAVID PÉREZ CABALLERO

B. Predoctorales / *Graduate Students*

M^a SOLEDAD VARA DE REY

Personal Técnico / *Technician*



Palabras clave: Complemento, alcaptonuria, epilepsia de Lafora, 3-metilcrotonilglicinuria, sine oculis, HUS, Factor M

Proteínas reguladoras de la activación del complemento. El cluster RCA en 1q32

El complemento es el mecanismo efector humoral más importante de la defensa natural o inespecífica, y está diseñado para defendernos de la infección generando componentes activos capaces de lisar los microorganismos o de revelar su presencia al sistema inmune celular. Su correcto funcionamiento requiere de reguladores de su actividad y de receptores para sus componentes activos en células del sistema inmune. La mayoría de estos componentes reguladores y receptores pertenece a la misma familia de proteínas. En 1985/6 describimos que sus genes están estrechamente ligados en un agrupamiento genético localizado en el brazo largo del cro-

Keywords: Complement, alkaptonuria, epilepsy of the Lafora type, 3-methylcrotonylglycinuria, sine oculis, HUS, Factor M

Complement regulatory proteins. The RCA gene cluster in 1q32

Complement is a major defence and clearance system in the bloodstream that is designed to fight infection by generating active elements that will have the potential of killing microorganisms or marking their presence to the cellular immune system. To function correctly the complement requires molecules regulating its activity and receptors for its active elements on immune system cells. The majority of these regulators and receptors belong to the same family of proteins and are coded by closely-linked genes within the RCA gene cluster, located on the long arm of chromosome 1 (1q32). Since we described the RCA gene cluster in 1985/6, research in our laboratory has been focused on the study of the genetics and function of the proteins that regulate the

mosoma 1 humano (1q32) que denominamos sistema RCA. Nuestro laboratorio mantiene desde entonces una línea de investigación centrada en el estudio funcional y genético de proteínas reguladoras del sistema del complemento. Los aspectos de la biología del sistema RCA que hemos abordado incluyen: i) Cartografía genética, incluyendo el clonaje y la secuenciación del sistema RCA humano y la caracterización de nuevos genes en esta región cromosómica; ii) Estudios comparativos y análisis de la evolución molecular del sistema RCA; iii) Caracterización de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de algunos de los genes del sistema RCA; iv) Interacción de proteínas reguladoras del complemento con patógenos microbianos; y v) asociación de los genes del sistema RCA y enfermedad. Actualmente la actividad del laboratorio en esta línea se centra en el estudio del papel de factor H en síndrome hemolítico urémico atípico y de C4BP en fibrosis y en trombosis.

Bases moleculares de la alcaptonuria

Alcaptonuria (AKU; McKusick número 203500), el ejemplo clásico de error metabólico congénito, es una enfermedad poco frecuente en la que el ácido homogentísico, un intermediario de la ruta catabólica de la fenilalanina no puede metabolizarse causando homogentísico aciduria (orina negra), ocronosis (pigmentación del tejido conjuntivo) y artrosis. Los pacientes AKU son deficitarios de homogentísico dioxigenasa (HGO, EC 1.13.11.5), la enzima que cataliza la conversión de homogentísato a maleilacetoacetato. Utilizando un modelo fúngico para alcaptonuria desarrollado por el Dr. M. A. Peñalva (CIB/CSIC) y aprovechando los enormes recursos generados por el Proyecto Genoma Humano, en 1996 clonamos el gen HGO humano y demostramos que los pacientes AKU son homocigotos o heterocigotos compuestos para mutaciones pérdida de función en HGO. En los años sucesivos hemos completado la caracterizado las bases moleculares, estructurales y la epidemiología genética de esta enfermedad. Más datos sobre esta línea de investigación en la dirección de Internet: <http://www.cib.csic.es/~akudb/index.htm>.

complement system. Aspects of RCA biology studied in our laboratory include: i) Genetic mapping of the RCA gene linkage group. This includes cloning, sequencing and characterization of new genes within the RCA; ii) Comparative studies and molecular evolution of the RCA linkage group; iii) Characterization of the molecular mechanisms that regulate the expression of some of the RCA genes; iv) Interaction of RCA proteins with microbial pathogens; and v) Association between RCA genes and disease. Actually we focus on the study of the roles of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome and of C4BP in fibrosis and thrombosis.

Molecular basis of alkaptonuria

Alkaptonuria (AKU; McKusick number 203500), the prototypic inborn error of metabolism, is a rare disease in which homogentisate, an intermediary product in the phenylalanine catabolic pathway, cannot be further metabolized and causes homogentisic aciduria, ochronosis and arthritis. AKU patients are deficient for homogentisate dioxygenase (HGO, EC 1.13.11.5), the enzyme mediating the conversion of homogentisate to maleylacetoacetate. In 1996, using a fungal model for alkaptonuria developed by Dr. M. A. Peñalva (CIB/CSIC) and taking advantage of the great resources made available by the Human Genome Project, we cloned the human HGO gene and demonstrated that AKU patients are homozygous, or compound heterozygous, for loss-of-function mutations in HGO. During these years we have completed the characterization of the molecular, structural and epidemiological bases of the disease. More information about this line of research is available at <http://www.cib.csic.es/~akudb/index.htm>.

Molecular basis of the progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type

The Lafora disease (LD, EPM2; MIM 254780) is the most frequent cause of progressive myoclonus epilepsy in Southern Europe. Most patients die within 10 years from the onset, following a rapid progression to a vegetative terminal state. LD is characterized by the presence of polyglucosan intracellular inclusion bodies (so-called Lafora bodies) showing a composition that resembles that of glycogen or amylopectin. LD is inherited as an autosomal recessive trait. The LD gene (EPM2A) is located in

Bases moleculares de la epilepsia mioclónica progresiva de Lafora

La enfermedad de Lafora (LD, EPM2; MIM 254780) es la causa más frecuente de epilepsia mioclónica progresiva en los países del sur de Europa. La mayoría de los enfermos fallecen antes de 10 años después del comienzo de la enfermedad tras evolucionar a un estado vegetativo terminal. La LD se caracteriza por la presencia sistémica de depósitos intracelulares de una sustancia intensamente PAS positiva (llamados cuerpos de Lafora) de composición similar al glucógeno o la amilopectina. LD se hereda como un carácter autosómico recesivo. El gen responsable de la LD (EPM2A) se localiza en 6q24. En 1999, en colaboración con el Dr. J.M. Serratosa (FJD), identificamos el gen responsable de LD y demostramos que codifica una proteína con homología con proteínas tirosin-fosfatasa duales (PTPasas) que denominamos LAFPTPasa. En esta línea de investigación pretendemos la caracterización funcional de la proteína LAFPTPasa y establecer por qué su ausencia determina la enfermedad de Lafora. Con este fin, estamos desarrollando una estrategia múltiple con aproximaciones genéticas, bioquímicas y de biología molecular y celular. Parte central en este proyecto es la utilización de técnicas genómicas y proteómicas. Esperamos que los resultados de este proyecto aporten datos sobre los procesos moleculares causantes de la patología y que este conocimiento permita delinear abordajes terapéuticos.

Bases moleculares de la 3-metilcrotonilglicinuria

La 3-metilcrotonilglicinuria es una metabolopatía en el catabolismo de la leucina que resulta del déficit de la enzima 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC). La incorporación de la espectrometría de masas en el screening neonatal de metabolopatías ha revelado que la incidencia de esta patología es mayor de lo que se suponía. La 3-metilcrotonilglicinuria se hereda con un patrón autosómico recesivo. Cuando iniciamos este proyecto, el estudio molecular de esta enfermedad no era posible porque los genes que codifican la MCC no se habían caracterizado. MCC es una enzima heterodimérica compuesta de subunidades alfa (conteniendo biotina) y beta, y es la única de las cuatro carboxilasas humanas dependientes de biotina que no se había caracterizado genéticamente. Los

6q24. In 1999, in collaboration with Dr. J.M. Serratosa (FJD) we identified the gene responsible for LD and demonstrated that it codes for a protein with homology to dual protein tyrosine phosphatases (PTPasas) that we denominated LAFPTPasa. In this line of research we will functionally characterize the LAFPTPasa protein and determine why its absence causes Lafora disease. To this end we are developing a multidisciplinary strategy, including genetic, biochemical and molecular and cellular biology approaches. Central to this approach is the use of genomic and proteomic approaches. We expect that our results will increase our understanding of the molecular processes underlying the pathology and that this knowledge will allow us to delineate therapeutic approaches.

The molecular bases of the 3-methylcrotonylglycinuria

3-Methylcrotonylglycinuria is an inborn error of leucine catabolism that results from the deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC). The introduction of tandem mass spectrometry in newborn screening has revealed an unexpectedly high incidence of this disorder. 3-methylcrotonylglycinuria has a recessive pattern of inheritance. When this project was initiated, the molecular studies of this disease were not possible because the genes encoding MCC were not characterized. MCC, an heteromeric enzyme consisting of alpha (biotin-containing) and beta subunits, was the only one of the four biotin-dependent carboxylases known in humans that was not genetically characterized. Patients belong to two complementation groups, depending the subunit that is affected. In collaboration with the laboratories of Dr. Ugarte (CBM) and Dr. Peñalva (CIB) we have developed a line of research with the objective of characterize the molecular bases of the 3-methylcrotonylglycinuria and complete the genetic characterization of the four human biotin-dependent carboxylases. Among the results already obtained in this project are the cloning and characterization of the MCCA and the MCCB genes (encoding the MCC alpha and MCC beta subunits, respectively) and the identification in them of disease-causing mutations in 3-methylcrotonylglycinuria patients of the two complementation groups.

pacientes se clasifican en dos grupos de complementación dependiendo de la subunidad afectada. En colaboración con los laboratorios de la Dra. M. Ugarte (CBM) y del Dr. M. A. Peñalva (CIB), hemos desarrollado una línea de investigación con el objetivo de determinar las bases moleculares de la 3-metilcrotonilglicinuria y completar la caracterización genética de las cuatro carboxilasas humanas dependientes de biotina. Entre los resultados ya alcanzados en este proyecto están la clonación y caracterización de los genes MCCA y MCCB (codificando las cadenas MCCalfa y MCCbeta, respectivamente) y la identificación de mutaciones en estos genes responsables de causar 3-metilcrotonilglicinuria en pacientes de los dos grupos de complementación.

Genes humanos de la familia SIX/sine oculis y su implicación en malformaciones congénitas

Tratando de aprovechar los avances en la caracterización de genes implicados en el desarrollo del ojo en otras especies, hemos desarrollado un proyecto de investigación, en colaboración con genetistas de la FJD (Dras. C. Ayuso y C. Ramos, Servicio de Genética) y de biólogos especialistas en desarrollo (Dra. P. Bovolenta, Instituto Cajal, CSIC), encaminado a caracterizar los genes homeobox humanos de la familia SIX/sine oculis y a determinar su implicación en malformaciones congénitas (inicialmente oculares). Entre los objetivos que se han alcanzado están: 1) La clonación de tres genes de la familia SIX/sine oculis humana (SIX2, SIX3 y SIX6). Uno de ellos, SIX6, no se había caracterizado antes en ninguna otra especie. 2) La localización cromosómica, caracterización de la estructura génica y organización genómica de los genes SIX humanos, y 3) El desarrollo de protocolos para el análisis mutacional de los genes SIX y el análisis de la implicación patológica de los genes SIX2 y SIX6. Como resultado de este estudio hemos excluido el gen SIX2 como responsable del síndrome ODED, y más importante, hemos concluido que SIX6 es un muy buen candidato posicional para microoftalmia/anoftalmia y alteraciones de la hipófisis.

Human genes of the SIX/sine oculis family and their implication in congenital malformations

The objective of this project is to get insight into the human genes implicated in congenital malformations from the knowledge generated in the characterization of developmental genes in other species. This is a collaborative study of our group with clinical geneticists from the Fundación Jiménez Díaz. (Dras. C. Ayuso y C. Ramos, Servicio de Genética) and biologists working in the development field (Dra. P. Bovolenta, Instituto Cajal, CSIC). The initial goals were to clone and characterize human genes of the SIX/sine oculis family and to determine their implication in ocular malformations. Among the objectives already achieved in this study are: 1) the cloning in humans of three genes of the SIX family (SIX2, SIX3 and SIX6). One of them, SIX6, is a novel gene that had not been cloned in any species. 2) The characterization of the chromosomal mapping, gene structure, and genomic organization of the human SIX genes., and 3) the development of protocols for the mutational analysis of the human SIX genes. As a result of these studies we have excluded the SIX2 gene as responsible of the ODED syndrome and, most important, we have concluded that SIX6 is a positional candidate for microphthalmia/anophthalmia and pituitary anomalies.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CEE, BMH4-CT96-1005 (1996-1999)
- CICYT, SAF-96/0055 (1996-1999)
- CAM, 08.6/0015/1997 (1998-200)
- FIS, 98/0687 (1998-2000)
- CAM, 08.1/0008/1998 (1999-2000)
- UE/CICYT, FEDER 2FD97-1292 (1999-2001)
- CICYT, SAF-99/0013-C02-01 (1999-2001)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Miguel Angel Díaz Guillén.** Análisis genético y molecular de la región cromosómica humana 1q31-32: Cartografía, identificación de nuevos genes e implicaciones fisiopatológicas. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Director: Santiago Rodríguez de Córdoba.

Publicaciones/Publications**Artículos en Revistas/Journal Articles**

- Beltrán-Valero de Bernabé, D., Jimenez, J., Aquaron, R., and Rodríguez de Córdoba, S. (1999). Analysis of alkaptonuria (AKU) mutations and polymorphisms reveals that the CCC sequence motif is a mutation hot spot in the homogentisate 1,2 dioxygenase gene (HGO). *Am. J. Human Genet.* 64, 1316-1322.
- Beltrán-Valero de Bernabé, D., Peterson, P., Luopajarvi, K., Krohn, K., Rodríguez de Córdoba, S., and Ranki A. (1999). Mutational analysis of the HGO Gene in Finnish Alkaptonuria Patients. *Journal of Medical Genetics* 36, 922-923.
- Criado García, O., Feraud Espinosa, I., Bovolenta, P., Sainz de la Cuesta, R., and Rodríguez de Córdoba, S. (1999). Expression of the beta-chain of C4b-binding protein in human ovary. *Eur J Cell Biol.* 78, 657-664.
- Díaz-Guillén, M.A., Rodríguez de Córdoba, S., and Heine-Suñer D. (1999). A radiation hybrid map of complement Factor H and Factor H-related genes. *Immunogenetics* 49, 549-552.
- Gallardo, E., López-Ríos, J., Feraud-Espinosa, I., Granadino, B., Sanz, R., Ramos, C., Ayuso, C., Seller, M., J., Brunner, H.G., Bovolenta P., and Rodríguez de Córdoba S. (1999). Genomic cloning and characterization of the human homeobox gene SIX6 reveals a cluster of SIX genes in chromosome 14 and associates SIX6 hemizyosity with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies. *Genomics* 61, 82-91.
- Granadino, B., Gallardo, M.E., López-Ríos, J., Sanz, R., Ramos, C., Ayuso, C., Bovolenta, P., and Rodríguez de Córdoba, S. (1999). Genomic cloning, structure, expression pattern and chromosomal location of the human SIX3 gene. *Genomics* 55, 100-105.
- López-Ríos J., Gallardo E., Rodríguez de Córdoba S., and Bovolenta P. (1999). Six9 (Optx2), a new member of the SIX gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development. *Mech. Develop.* 83, 155-159.
- Rodríguez de Córdoba, S., Díaz-Guillén, M. A., and Heine-Suñer, D. (1999). An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32. *Mol Immunol.* 36, 803-808.
- Serratos, J.M., Gómez-Garre, P., Gallardo, M.E., Berta Anta, B., Daniel Beltrán-Valero de Bernabé, D., Lindhout, D., Tassinari, C.A., Michelucci, R., Malafosse, A., Topcu, M., Grid, D., Dravet, C., Berkovic, S.F., and Rodríguez de Córdoba, S. (1999). A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonic epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum. Mol. Genet.* 8, 345-352.
- Celli, J., van Beusekom, E., Hennekam R.C.M., Gallardo, M. E., Smeets, D. F.C.M., Rodríguez de Córdoba S., Innis, J.W., Frydman M., Köning R., Tolmie, J., Govaers L. C. P., van Bokhoven H., and Brunner, H. G. (2000). Familial syndromic esophageal atresia maps to 2p23-p24. *Am. J. Human Genet.* 66, 436-444.
- Gómez-Garre, P., Sanz, Y., Rodríguez de Córdoba S., and Serratos, J.M. (2000). Mutation and polymorphism analysis in the human EPM2 gene in Lafora disease patients. *Eur. J. Human Genetics* 8, 946-954.
- Pérez-Caballero D., Albertí, S., Vivanco, F., Sánchez-Corral P., and Rodríguez de Córdoba, S. (2000). Assessment of the interaction of human complement regulatory proteins with group A streptococcus. Identification of a high affinity GAS-binding site in FHL-1. *Eur. J. Immunol.* 30, 1243-1253.
- Porfirio, B., Chiarelli, I., Graziano, C., Mannoni, A., Morrone, A., Zammarchi, E., Beltrán-Valero de Bernabé, D., and Rodríguez de Córdoba, S. (2000). Alkaptonuria in Italy: Polymorphic Haplotype Background, Mutational Profile and Description of 4 Novel Mutations in the Homogentisate 1,2-dioxygenase Gene. *Journal of Medical Genetics* 37, 309-312.
- Rodríguez, J.M., Timm, D.E., Titus, G.P., Beltrán-Valero de Bernabé, D., Criado, O., Mueller, H.A., Rodríguez de Córdoba, S., and Peñalva M.A. (2000). Structural and functional analysis of mutations in alkaptonuria. *Hum Mol Genet* 22, 2341-2350.
- Sánchez-Corral P., Bellavia D., Amico L., Brai M., and Rodríguez de Córdoba S. (2000). Molecular basis for factor H and FHL-1 deficiency in an Italian family. *Immunogenetics* 51, 366-369.
- Spiller O.B., Criado García, O., Rodríguez de Córdoba, S., and Morgan B.P. (2000). Cytokine-mediated upregulation of CD55 and CD59 protects human hepatoma cells from complement attack. *Clin. Exp. Immunol.* 121, 1-9.
- Titus G.P., Mueller H.A., Rodríguez de Córdoba S., Peñalva M.A., and Timm D.A. (2000). Crystal structure of human homogentisate dioxygenase. *Nat Struct Biol.* 7, 542-546.
- Zatková, A., Beltrán Valero de Bernabé, D., Poláková, H., Zvarik, M., Feráková, E., Bořák, V., Ferák, V., Kádasi, L., and Rodríguez de Córdoba S. (2000). High frequency of alkaptonuria in Slovakia. Evidence for the appearance of multiple mutations in HGO involving different mutational hot spots. *Am. J. Human Genet.* 67, 1333-1339.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Rodríguez de Córdoba, S., Criado García, O., and Sanchez Corral, P. (1999). C4b Binding Protein. En *The Complement Factsbook*. Morley and Walport Eds. Academic Press, London, pp 161-167.
- Rodríguez de Córdoba, S., and Vivanco, F. (2000). Complemento. En *Medicina Interna (14th Edition)*. Farreras and Rozman, Eds. pp: 3093-3098.
- Sala, N., Rodríguez de Córdoba, S., and Estivill, X. (2000). Genoma Humano. En *Medicina Interna (14th Edition)*. Farreras and Rozman, Eds. pp. 1372-1386.

Virología Molecular de Vaccinia

Molecular Virology of Vaccinia

EDUARDO PÁEZ ABRIL
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Marta Elena Gómez Ureña (Hasta XII-1999)
MARIA DEL CARMEN SANCHEZ MOLINA (Hasta III-1999)
ESTHER TAPIA CORRALES (Hasta V-1999)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

FRANCISCO GARCÍA TABARES
BARBARA MORENO JIMÉNEZ (Hasta V-1999)
Personal Técnico / *Technician*

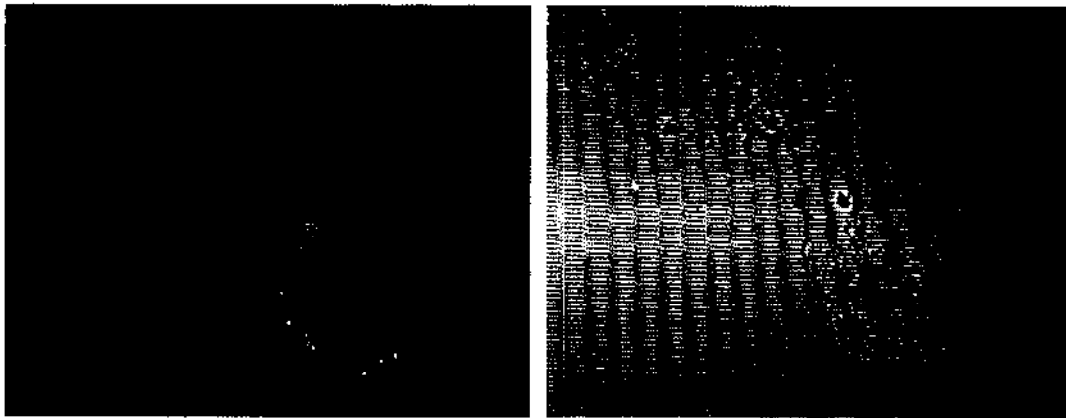


Figura 1: Microscopía confocal de los diferentes tipos de virus vaccinia presentes en el exterior de las células infectadas. Células BSC-40 infectadas durante 18 horas fueron incubadas con anticuerpos específicos de proteínas presentes en las membranas externas de virus envueltos o desnudos y marcadas posteriormente con los fluorocromos Texas-Red y Cy2, respectivamente. Se observa la presencia de virus envueltos de color rojo, virus desnudos de color verde y algunos virus con envuelta rota de color amarillo.

Mecanismo de la fusión celular inducida por el virus vaccinia: identificación y caracterización de las proteínas implicadas y su aplicación al desarrollo de nuevos vectores recombinantes más seguros

El virus vaccinia es la especie tipo del género Orthopoxvirus y es bien conocido por su utilización como vacuna viva en la única campaña de vacunación que ha conseguido la erradicación de una enfermedad viral, como es el caso de la viruela. El virus vaccinia u otros virus relacionados pueden ser utilizados en el futuro como vacuna viva contra otros patógenos de importancia médica y veterinaria. Este proyecto pretende identificar y caracterizar proteínas de membrana de virus vaccinia implicadas en el fenómeno de fusión celular y diseminación víricas con el fin de definir los mecanismos de infectividad y patogénesis de este virus humano y de obtener mejores vectores basados en el virus vaccinia que pudieran tener una aplicación en incrementar la seguridad como vector de expresión en el laboratorio y en el desarrollo futuro de nuevas vacunas recombinantes. Utilizando una colección de mutantes atenuados del virus vaccinia con alteraciones en proteínas de membrana, así como virus recombinantes obtenidos a partir del rescate de marcadores genéticos en virus mutantes o por mutagénesis insercional en el virus salvaje, o alternativamente mediante la utilización de vectores de expresión transitoria, se caracterizarán una serie de genes involucrados en interacciones virus-huésped cuya posible función podría tener importantes implicaciones en virulencia *in vivo*. Se analizará la posible función de estos genes en la replicación viral *in vitro* e *in vivo*, mediante la obtención de virus recombinantes y la expresión de estos genes en sistemas procarióticos y eucarióticos. Por último, se valorará la eficacia de estos virus recombinantes atenuados con respecto al virus salvaje. Se están obteniendo también virus recombinantes que expresan proteínas heterólogas posiblemente implicadas en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y tumorales. Se ha analizado la modificación de la respuesta inmune frente a estas proteínas y su capacidad terapéutica. Estos virus recombinantes, además de su aportación al conocimiento del mecanismo molecular de la respuesta inmune, permiten augurar nuevas vías en el tratamiento de estas importantes enfermedades.

Mechanism of vaccinia virus induced cellular fusion: identification and characterization of viral proteins involved and implications in the development of safer recombinant vectors

Vaccinia virus is the prototype of the Orthopoxvirus group. A vaccine prepared with live vaccinia virus was used in the first example of a worldwide immunization program that successfully eradicated a human disease, smallpox. Vaccinia virus might be used in the near future as a recombinant vaccine against several pathogens with human and veterinary importance. This project proposes the identification and characterization of vaccinia virus membrane proteins involved in virus-induced cellular fusion and viral dissemination to define the mechanisms of infectivity and pathogenesis of this human virus. This study will be useful to generate safer expression vectors to be used in the laboratory and to develop new recombinant vaccines in the future. A collection of attenuated mutants of vaccinia virus with mutations in viral membrane proteins and virus recombinants obtained by marker rescue of specific mutations or by insertional mutagenesis of specific genes in wild-type virus will be used to characterize genes involved in virus-host interactions, which might have important implications in virulence. Transient expression vectors will also aid toward deciphering the function of these genes. The role of these genes in viral replication *in vitro* and *in vivo* will be determined. To this end, virus recombinants will be obtained. Expression of viral proteins in prokaryotic and eukaryotic systems will allow to further characterize the function of these genes. Finally, the efficacy of these attenuated virus recombinants when compared with the wild-type virus will be tested. We have also obtained recombinant viruses expressing heterologous proteins which are most likely involved in autoimmune and tumoral disease development. We have analyzed *in vivo* the immune response and its therapeutic ability. These recombinant viruses may be considered as valuable tools toward deciphering the molecular mechanism of the immune response and they provided new avenues of therapeutic intervention in these important diseases.

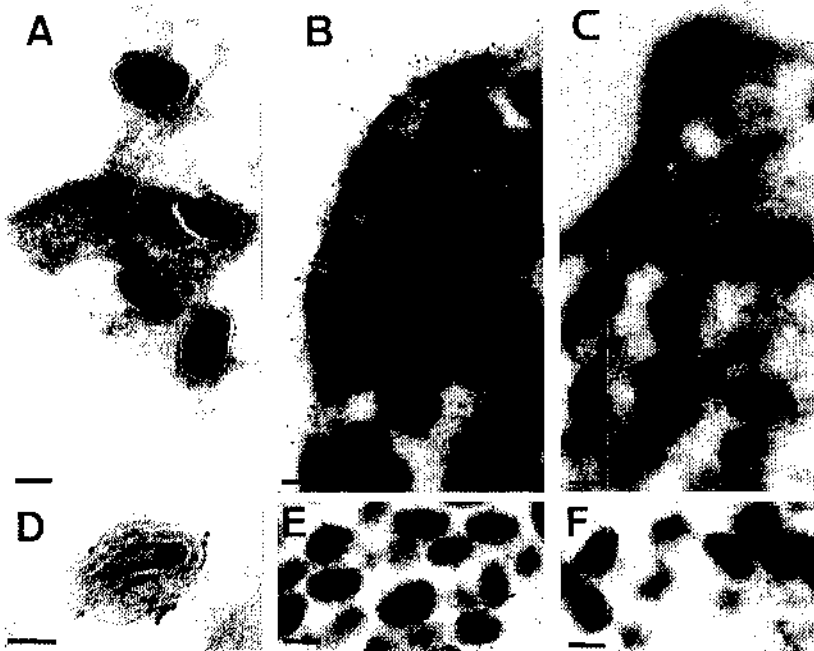


Figura 2: Crioinmunomicroscopía electrónica de virus vaccinia mutantes incapaces de formar virus extracelular envuelto. Células BSC-40 fueron infectadas durante 18 horas con los virus salvaje (A,D), 101-14 (B,E) y 65-16 (C,F). Las criosecciones fueron incubadas con anticuerpos específicos de una proteína presente en la envuelta del virus (A,B,C) y de una proteína presente en la membrana externa del virus sin envuelta (D,E,F) y marcada con partículas de oro de 10nm unidas a proteína A. Los virus mutantes permanecen retenidos en el interior celular al no ser capaces de formar virus envuelto. En estas condiciones, la proteína de la envuelta se acumula en la membrana plasmática.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PM97-0142 (1998-2001)
- DGI/CAM, 08.2/0032.1/1999. (1999-2000)

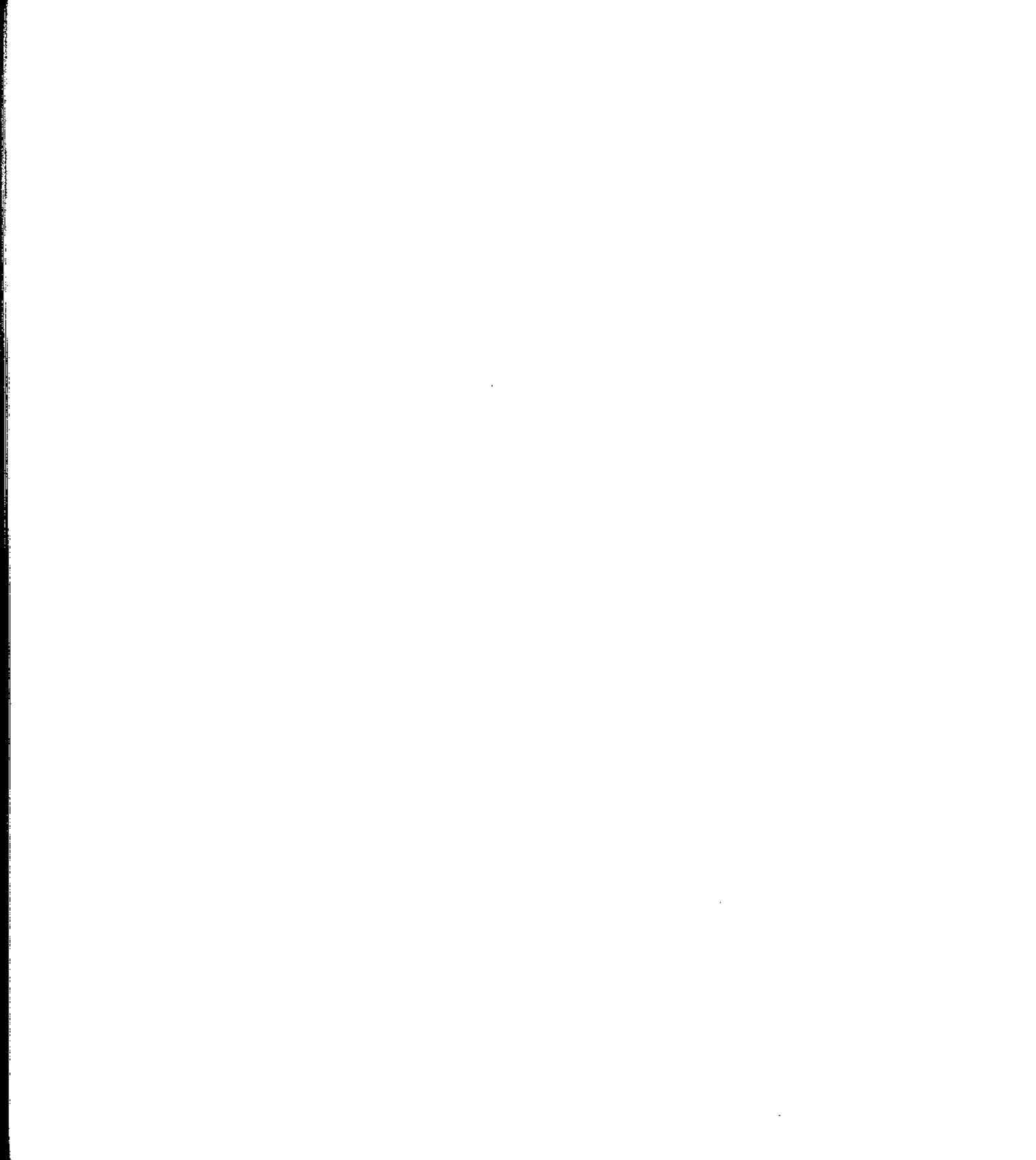
Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **M^a Carmen Sancho Molina**. Caracterización de proteínas de membrana del virus vaccinia involucradas en interacción virus-huésped. Universidad Autónoma de Madrid, 1999. Director: Eduardo Páez Abril.
- **Esther Tapia Corrales**. Mecanismo de la fusión celular inducida por el virus vaccinia. Universidad Autónoma de Madrid, 1999. Director: Eduardo Páez Abril.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Raab, U., Velasco, B., Lastres, P., Letamendía, A., Calés, C., Langa, C., Tapia, E., López-Bote, J.P., Páez, E., and Bernabéu, C. (1999). Expression of normal and truncated forms of human endoglin. *Biochem. J.* 339, 579-588.
- Abdalla, S.A., Pece-Barbara, N., Vera, S., Tapia, E., Páez, E., Bernabéu, C., and Letarte, M. (2000). Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1227-1237.



Departamento de Microbiología Molecular

Department of Molecular Microbiology

Jefe de Departamento
Department Head

RUBENS LÓPEZ GARCÍA

Profesores de Investigación

ERNESTO GARCÍA LÓPEZ
JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ
RUBENS LÓPEZ GARCÍA
MIGUEL ÁNGEL PENALVA SOTO

Investigadores Científicos

RAMÓN DÍAZ OREJAS
CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA
JUAN ANTONIO LEAL OJEDA
ÁNGEL T. MARTÍNEZ FERRER

Científicos Titulares

EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ
M^a ELENA FERNÁNDEZ-TRESQUERRES
PEDRO GARCÍA GONZÁLEZ
RAFAEL GIRALDO SUÁREZ
ALDO GONZÁLEZ BECERRA
M^a DEL CARMEN GUTIÉRREZ RUEDA
MARÍA JESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ
MARÍA TERESA SUÁREZ GONZÁLEZ

Titulados Superiores Especializados

SARA ISABEL PÉREZ PRIETO
SYLVIA RODRÍGUEZ SAINT-JEAN

Personal Técnico

ELOY BLANCO MARCOS (Hasta VIII-2000)
ELOÍSA CANO CONGOSTO
MANUEL CARRASCO FERNÁNDEZ
LUIS MANUEL GUAITA BENEIT
ÁNGELES GUIJARRO RODRÍGUEZ
JESÚS LÓPEZ RAMÍREZ
PILAR MARCILLA CAVANILLAS (Hasta XII-1999)
ROSA MARTÍNEZ DALMAU (Desde X-2000)
FRANCISCA PILAR MORANTE GONZÁLEZ
BÁRBARA MORENO JIMÉNEZ
CONSUELO PARDO ABARRIO
TERESA RAPOSO TRIAYO
ELENA REYO HERNÁNDEZ
M^a MERCEDES SÁNCHEZ CARMONA
ANA M^a SERRANO LÓPEZ

Secretaria

M^a VICTORIA LAFITA TOGORES

Biodegradación de la Lignina

Lignin Biodegradation

ÁNGEL T. MARTÍNEZ FERRER

Jefe de Grupo / Group Leader

M^oJESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

JOSÉ MARÍA BARRASA

Doctor Vinculado / Associated Scientist

FRANCISCO GUILLÉN CARRETERO

Investigador Contratado / Research Associate

SUSANA CAMARERO FERNÁNDEZ

OSCAR MARIANO NUERO GARCÍA (Desde VI-2000)

JAVIER RUIZ DUEÑAS (Desde V-2000)

ELISA VARELA SANZ (Hasta X-1999)

B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

OLGA CALERO RUEDA

PATRICIA FERREIRA NEILA (Desde IV-2000)

VÍCTOR GÓMEZ TORIBIO

DAVID IBARRA TREJO (Desde IV-2000)

VÍCTOR LEANDRO PAPINUTTI (Desde X-2000)

MARIO CARLOS NAZARENO SAPARRAT

(Desde IV-1999 Hasta II-2000)

MARTA PÉREZ BOADA

ENRIQUE RODRÍGUEZ SÁNCHEZ (Desde XII-1999)

MARIELA SPERANZA (Desde IV-1999)

B. Predoctorales / Graduate Students

ÁNGELES GUIJARRO RODRÍGUEZ

TERESA RAPOSO TRIANO

Personal Técnico / Technicians

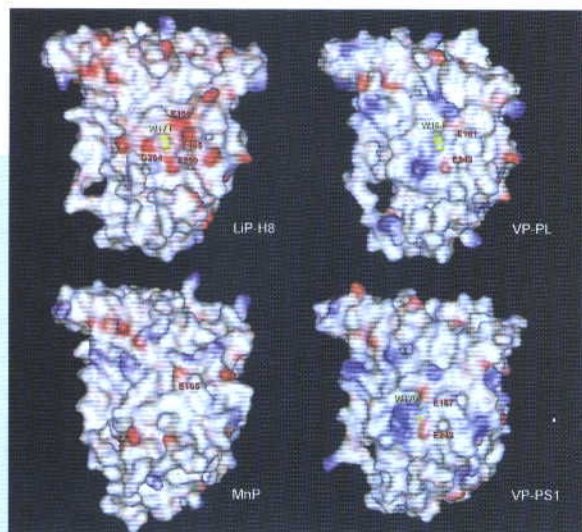


Figura: Región que rodea al triptófano superficial (amarillo) implicado en la oxidación del alcohol veratrílico por la nueva peroxidasa versátil (VP) de *Pleurotus eryngii* (isoenzimas PL y PS1) y la lignina peroxidasa (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium* (isoenzima H8) y región equivalente en la manganeso peroxidasa (MnP) de *Phanerochaete chrysosporium*

Figure: Region surrounding an exposed tryptophan (yellow) involved in veratryl alcohol oxidation by the new versatile peroxidase (VP) from *Pleurotus eryngii* (isoenzymes PL and PS1) and lignin peroxidase (LiP) from *Phanerochaete chrysosporium* (isoenzyme H8) and corresponding region in manganese peroxidase (MnP) from *Phanerochaete chrysosporium*

Palabras clave: Lignina, peroxidases, lacasas, biotecnología, biodegradación

Keywords: Lignin, peroxidases, laccases, biotechnology, biodegradation

Metaloenzimas de hongos que oxidan compuestos aromáticos de interés industrial o medioambiental

Fungal metalloenzymes oxidizing aromatic compounds of industrial interest

A fin de saber como los basidiomicetos ligninolíticos son capaces de degradar compuestos aromáticos recalcitrantes y aprovechar esta información para diseñar nuevos bioprocesos, se definieron los siguientes objetivos: i) Optimizar sistemas de expresión para peroxidases y lacasas de hongos (para ser utilizados en ingeniería de proteínas y fermentaciones industriales) comparando el repliegado de la proteína recuperada a partir de cuerpos bacterianos de inclusión, la expresión mejorada en ascomicetos industriales y el desarrollo de un sistema de expresión en basidiomicetos; ii) caracterizar en términos de relaciones estructura-función algunas de las metaloenzimas más relevantes producidas por los basidiomicetos y, basándose en esta información, mejorar las propiedades catalíticas de algunas de ellas para su aplicación industrial utilizando técnicas de ingeniería de proteínas; iii) desarrollar procesos eficaces de fermentación para la producción de las metaloenzimas más prometedoras usando los sistemas de expresión desarrollados, y evaluar su aplicación industrial en la producción de alimentos, fabricación de papel (como alternativa a procesos contaminantes) y/o otras aplicaciones respetuosas con el medio ambiente.

In order to understand how ligninolytic basidiomycetes manage to degrade recalcitrant aromatic compounds and to take advantage of this to design new bio-processes the following objectives are defined: i) To optimize an expression systems for fungal peroxidases and laccases (to be used for protein engineering and industrial fermentation) by comparing refolding of protein from bacterial inclusion bodies, improved expression in industrial ascomycetes, and development of a basidiomycete expression system; ii) to characterize in terms of structure-function relationships some of the most relevant metalloenzymes produced by basidiomycetes and, based on the above information, to improve the catalytic properties of some of them for industrial application by protein engineering techniques; and iii) to develop efficient fermentation processes for the production of the most promising metalloenzymes using the expression tools developed, and to evaluate their industrial applicability in food production, paper pulp manufacture (as alternative to contaminating processes) and/or other environmentally-sound applications.

El plan de trabajo incluye las siguientes tareas: i) clonación de peroxidases y lacasas (para optimización de la expresión, mutagénesis dirigida y fermentación con enzimas recombinantes); ii) Expresión en *Escherichia coli* y producción de enzima activa (replegado de proteína a partir de los cuerpos de inclusión); iii) expresión de metaloenzimas fúngicas en ascomicetos (utilizando *Emericella nidulans* como referencia y *Aspergillus oryzae* para la expresión industrial); iv) Expresión de metaloenzimas en basidiomicetos usando *Schizophyllum commune* como modelo, con objeto de desarrollar un nuevo modelo de expresión en el basidiomiceto industrial *Pycnoporus cinnabarinus* v) Aislamiento y caracterización de enzimas relevantes (incluyendo una nueva peroxidasa); vi) Análisis de espectroscopía de NMR y difracción de rayos x (para obtener modelos moleculares e información estructural sobre las enzimas nuevas y recombinantes); vii)

The workplan includes the following workpackages: i) Cloning DNA encoding peroxidases and laccases (for optimization of expression, site-directed mutagenesis, and recombinant enzyme fermentation); ii) Expression in *Escherichia coli* and production of active enzyme (refolding of protein from inclusion bodies); iii) Fungal metalloenzyme expression in Ascomycetes (using *Emericella nidulans* as a reference and *Aspergillus oryzae* as a fungal host for industrial expression); iv) Metalloenzyme expression in Basidiomycetes (using *Schizophyllum commune* as a model to develop a new expression system in the industrial basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*); v) Isolation and characterization of relevant enzymes (including new peroxidase); vi) NMR spectroscopy and crystallographic analysis (to obtain molecular models and structural information on new and recombinant enzymes); vii) Structure-function and protein modification studies (for elucidation of key aspects of enzyme catalysis and production of improved variants); viii) Fermentation technology for metalloenzyme production (using the most adequate host systems); and ix)

Estudios estructurales y modificación de proteínas (utilizando los sistemas de expresión más adecuados) y ix) evaluación de la aplicabilidad industrial de las enzimas estudiadas (incluyendo los sectores de alimentación y papel).

A causa de la alta multidisciplinariedad requerida el proyecto incluye grupos con experiencia en i) biotecnología (CIB-CSIC, ES, y UHEL, FI); ii) genética de hongos (RuG, NL, e INRA, FR); iii) ingeniería de peroxidasas (USussex, GB) y iv) NMR (UFIR, IT) y difracción de rayos X (ETH, CH); junto con v) dos compañías productoras de enzimas con experiencia en producción de proteínas recombinantes (Frimond, BE, y Novozymes, DK). Este consorcio, con participantes de 8 países miembros de la UE y Suiza, da al proyecto una fuerte dimensión europea.

Nuevos métodos respetuosos con el medioambiente para el control del "pitch" en diferentes procesos de fabricación de papel

El primer objetivo es desarrollar métodos respetuosos con el medio ambiente para el control del "pitch" durante la fabricación de papel basados en: i) el estudio de los extraíbles de la madera durante la fabricación de pasta kraft de eucalipto y pasta TMP de *Picea*, y la identificación de los compuestos responsables de los depósitos de "pitch"; ii) cepas de hongos seleccionadas capaces de eliminar los extraíbles de ambos tipos de madera; iii) nuevas enzimas (nativas o modificadas) capaces de degradar los compuestos en las pastas o en los líquidos de proceso y iv) métodos físico-químicos mejorados para eliminar el "pitch" o disminuir su depositabilidad. El segundo objetivo es desarrollar los anteriores métodos a escala piloto incluyendo: i) optimización del crecimiento fúngico y formulación de inóculos; ii) protocolos optimizados para la producción de las nuevas enzimas desarrolladas, iii) combinación de tratamientos enzimáticos y físico-químicos; iv) pasteo y blanqueo a escala piloto; v) análisis de las ventajas de los nuevos procesos en términos de eliminación de extraíbles, depositabilidad del "pitch", parámetros de proceso y toxicidad de los efluentes; vi) evaluación del interés comercial para diferentes materias primas, procesos de fabricación y mercados mundiales.

El plan de trabajo incluye estudios sobre los compuestos extraíbles con objeto de saber como son modificados quími-

Evaluation of the industrial application of the enzymes studied (including food and pulp-paper sectors).

Because of high multi-disciplinarity required, the project consortium includes groups with expertise in: i) biotechnology (CIB-CSIC, ES; and UHEL, FI); ii) fungal genetics (RuG, NL; and INRA, FR); iii) peroxidase engineering (USussex, GB); and iv) protein NMR (UFIR, IT) and x-ray diffraction analyses (ETH, CH); together with v) two enzyme-producing companies with experience in recombinant protein production (Frimond, BE; and Novo Nordisk, DK). The above consortium (with partners from eight EU members and Switzerland) gives the proposal a strong European dimension.

New environmentally-sound methods for pitch control in different paper pulp manufacturing processes

To design environmentally-sound methods for pitch control during manufacture of selected paper pulps based on: i) previous balance of extractive-derived compounds during manufacturing of eucalypt Kraft pulp and spruce TMP pulp, and identification of compounds responsible for pitch deposition; ii) selected fungal strains removing extractives from both wood types; iii) new (native or engineered) enzymes being able to degrade target compounds in pulps or liquids; and iv) improved physicochemical methods to remove pitch or decrease depositability. To develop the above pitch control methods at a pilot scale including: i) fungal growth optimization and formulation of inocula to treat wood; ii) optimized protocols for production of the new enzymes developed; iii) combined enzymatic-physicochemical treatments; iv) pilot-scale pulping and bleaching including the above optimized treatments; v) analysis of advantages of the new processes in terms of extractive removal, pitch depositability, pulp and process parameters, and effluent toxicity; and vi) evaluation of their commercial interest for different raw materials, pulping processes and world markets.

The work plan established includes studies on wood extractive compounds to show how they are chemically-modified or degraded in the course of the pulp manufacturing processes, which of them survive pulping and bleaching, how colloidal pitch stability and depositability are modified, and what are the main compounds responsible for the formation of deposits as well as the main reactions and mechanisms involved. Then, biological treatments will be developed with the aim of reducing deposit for-

camente durante la fabricación de pasta, cuales sobreviven en los procesos de pasteo y blanqueo, como se modifican la estabilidad y depositabilidad del "pitch" coloidal y cuales son los principales compuestos responsables de los depósitos y las reacciones implicadas en su formación. Se desarrollarán tratamientos biológicos para reducir la formación de depósitos y obtener ventajas adicionales (ambientales o de proceso). Se investigarán hongos seleccionados y se optimizará la inoculación y condiciones de tratamiento (para maderas de eucalipto y *Picea*) comparados con CartapipTM. Estos estudios incluirán experimentos de pasteo/blanqueo para evaluación de las propiedades de cocción, refinado y fabricación de papel, producción de inóculos microbianos y el tratamiento de la madera a escala piloto. El uso de enzimas ofrece ventajas adicionales para el control del "pitch" al poder incluirlas en diferentes fases del proceso. Actualmente, la ResinaseTM y otras lipasas se están comercializando para el proceso de tratamiento del "pitch". Sin embargo éstas son de poca utilidad en muchos procesos de fabricación de pasta de papel ya que su acción se limita a los glicéridos, que en muchos casos no son los principales responsables de los depósitos. Para ampliar el potencial de los tratamientos enzimáticos para el control de "pitch" se explorarán dos alternativas: i) la búsqueda de nuevas enzimas en hongos que degraden eficazmente los extraíbles del eucalipto y la *Picea* (utilizando compuestos sencillos, "pitch" sintético y otros sustratos); y ii) mejorando las enzimas industriales ya conocidas mediante las herramientas proporcionadas por la ingeniería genética. Finalmente varios métodos físico-químicos mejorados para el control del "pitch", basados en la flotación por aire disuelto y la ultrafiltración serán investigados y se evaluará su complementariedad con los tratamientos biológicos. El proyecto incluye grupos con experiencia en microbiología, biotecnología, ingeniería y química; centros técnicos y compañías de biotecnología y producción de papel, de 5 países europeos.

Nuevas peroxidasas y oxidasas de *Pleurotus*: Estudios estructurales y expresión heteróloga en relación con la biodegradación de compuestos aromáticos de interés industrial o medioambiental

Los objetivos generales del proyecto son: i) profundizar en el conocimiento de los aspectos más relevantes de la estruc-

mation and obtaining additional environmental or process improvements. Selected fungal strains will be investigated and optimized inoculation and treatment conditions (for both eucalypt and spruce wood) defined at the laboratory scale (compared with CartapipTM). These studies will include pulping/bleaching experiments for evaluation of cooking, refining and papermaking properties, the subsequent production of microbial inocula, and the treatment of wood at pilot-scale. The use of enzymes offers additional advantages for pitch control due to the possibility of including them at different stages of pulping and bleaching. Currently, ResinaseTM and other lipases are being commercialized for pitch control. However, they are of limited utility in many pulping processes because their action is limited to glycerides, which in many cases are not the main responsible for pitch deposition. In order to expand the potential of enzymatic treatments for pitch control, two alternatives will be explored based on: i) the search for new enzymes in fungi efficiently-degrading eucalypt and spruce extractive compounds (using simple target compounds, "synthetic pitch" and other substrates); and ii) enlarging the potential of the already-known industrial enzymes for pitch control by the use of tools provided by the genetic engineering. Finally, several improved physicochemical methods for the control of pitch deposition based on dissolved-air flotation and ultrafiltration technologies, and their complementarity with the biological ones will be investigated. The project includes academic groups with expertise in microbiology, biotechnology, engineering and chemistry, technical centers, and biotechnology and paper pulp-producing companies, from 5 EU countries.

Novel peroxidases from *Pleurotus*: Structural studies and heterologous expression related to biodegradation of aromatic compounds with industrial or environmental interest

*The project focuses on two enzymes (a peroxidase and an oxidase) acting synergistically for lignin degradation by *Pleurotus eryngii*, a fungus of biotechnological interest due to its capabilities to degrade lignin selectively. The peroxidase is different from other peroxidases described till the present, and has high versatility for degradation of recalcitrant aromatic compounds, since it shares catalytic properties of the well-known lignin peroxidase and Mn-peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* (and oxidizes also some compounds that are not efficiently oxidized by the latter enzymes). The second enzyme considered is aryl-alcohol*

tura molecular de las nuevas peroxidases y oxidasas (descubiertas en hongos del género *Pleurotus*) en relación con su actividad catalítica, mediante la cristalización y el modelado molecular y la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida (que permitirán posteriormente modificar sus propiedades catalíticas, de estabilidad u otras en relación con diferentes tipos de aplicaciones), ii) estudiar y optimizar la expresión de los correspondientes genes (varios de ellos clonados recientemente) en organismos modelo y en los sistemas utilizados para la producción industrial de enzimas así como los procedimientos de producción y purificación de las enzimas recombinantes obtenidas, y iii) investigar los aspectos más relevantes de los mecanismos de acción de las enzimas nativas y sus variantes obtenidas por mutagénesis dirigida, sobre algunos sustratos aromáticos de interés industrial o medioambiental (a la luz de los modelos moleculares obtenidos).

Utilización de fibras no madereras: Nuevas secuencias de blanqueo para la fabricación de pastas con diferentes grados de deslignificación y distintos usos industriales

El principal objetivo de esta investigación es la mejora en la fabricación de pasta de papel a partir de ciertas plantas anuales, centrándose principalmente en el estudio del blanqueo (sin la aplicación de cloro elemental (ECF) y sin sus derivados (TCF)) con la utilización de técnicas biotecnológicas.

En particular, los objetivos son los siguientes: 1) Mejora en la fabricación de pastas a partir de lino y kenaf; 2) Obtención de pastas crudas con diferentes grados de deslignificación; 3) Desarrollo de nuevos métodos de blanqueo sin cloro elemental y derivados (ECF y TCF) encaminados a su utilización en especies no madereras (lino y kenaf); 4) Utilización de técnicas biotecnológicas basadas en tratamientos enzimáticos: xilanasas (comerciales), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (laboratorio); 5) Determinación del mediador de MnP y lacasa apropiado para la aplicación en el blanqueo comercial; 6) Estudio de la influencia de los tratamientos enzimáticos y del blanqueo ECF y TCF en las propiedades de la pasta y de los efluentes; 7) Producción de enzima (MnP y lacasa); 8) Estudio de la influencia de los tratamientos enzimáticos y del blanqueo ECF y TCF en relación con las propiedades de las pastas (incluyendo envejecimiento

oxidase, a new oxidase characterized by its ability to generate hydrogen peroxide during oxidation of aromatic substrates. Both enzymes were described and characterized for the first time at the CIB, and were recently cloned and sequenced. The present project includes: i) structural analysis of these proteins (x-ray diffraction after crystallization, and molecular modeling) and modification of relevant amino-acid residues (by specific chemical reactions and site-directed mutagenesis); ii) studies on heterologous expression in prokaryotic and eukaryotic systems (including microorganisms of industrial interest); and iii) evaluation of catalytic properties and industrial or environmental interest of the native enzymes and their variants including determination of kinetic constants and studies on their action on simple xenobiotics, lignin or lignin-derived compounds in paper pulp samples provided by ENCE (the second manufacturer of eucalypt paper pulp in the world).

Utilization of non-woody fibres: New bleaching sequences for the manufacture of pulps with different degrees of delignification and different industrial uses

The general objective of this research is to improve the manufacture of pulp from certain annual plants by studying specially bleaching (without elemental chlorine (ECF) and chlorine compounds (TCF)), stressing the use of biotechnological techniques. Particular objectives are: 1) To improve the manufacture of pulps from flax and kenaf; 2) To obtain unbleached pulps with different degrees of delignification; 3) To develop new methods of elemental and totally chlorine free bleaching processes (ECF and TCF), and designed for the processing of non wood species: flax and kenaf; 4) Use of biotechnological techniques based on enzymatic treatments: xylanases (commercial), manganese peroxidase and laccase (laboratory); 5) To find out appropriate manganese peroxidase and laccase mediator to apply in commercial bleaching; 6) To study the influence of enzymatic treatments and ECF and TCF bleaching on pulp and effluent properties; 7) Enzyme production (manganese peroxidase and laccase); 8) To study the influence of enzymatic treatments and ECF and TCF bleaching in relation to pulp (aging, refining..) and paper properties (tensile..) as well as effluent properties (COD, color..); and 9) Industrial bleaching, refining and pulp and paper properties.

This proposal fully complies with the following priorities of the Spanish R&D Programme of Chemical Technologies: "1.1)

y refino), de los papeles (incluyendo propiedades ópticas y de resistencia) y de los efluentes (incluyendo DQO y color); y 9) Realización de pruebas industriales.

Los objetivos del proyecto se enmarcan dentro de las prioridades científico-técnicas del Programa Nacional de "Tecnologías de Procesos Químicos" en sus apartados: "1.1) Nuevos principios de diseño que optimicen procesos, abran nuevos campos de producción o supongan ventajas notables desde el punto de vista medioambiental; 1.4) Innovación de procesos convencionales. Incorporación de tecnologías ya probadas que puedan suponer mejoras en el rendimiento y selectividad; y 3.1) Mejora del ciclo de vida y de las propiedades del producto. Configuración del proceso condicionada por la calidad del producto final. Análisis de los parámetros de definición de calidad para su optimización".

Los principales resultados que se esperan obtener son los siguientes: a) Mejora en la utilización de especies no madereras con el principal propósito de la obtención de pasta de papel; b) Mejora en el blanqueo de especies no madereras utilizando métodos menos contaminantes; c) Ahorro en los reactivos de blanqueo mediante la utilización de métodos biotecnológicos sin afectar en las propiedades finales de la pasta; d) Mejora de los sistemas enzima/mediador- aplicados a los procesos de blanqueo comerciales; e) Incremento del rendimiento en relación a la utilización de materias primas; y f) Mejor comprensión del mecanismo de blanqueo según métodos no contaminantes y su relación con las propiedades de permanencia de las pastas.

Biodegradación de compuestos aromáticos contaminantes de suelos por hongos del género *Pleurotus*

El objetivo es la utilización de hongos basidiomicetos del género *Pleurotus* para la degradación de xenobióticos, con vistas a desarrollar estrategias de biorremediación de suelos en la comunidad de Madrid. Esta línea de investigación se basa en la inespecificidad del sistema degradativo desarrollado por estos hongos para despolimerizar y mineralizar la lignina, polímero aromático estructuralmente relacionado con muchos de los compuestos que causan problemas de contaminación en suelos. El plan de trabajo incluye: i) la evaluación de la capacidad de los hongos del género *Pleurotus* para degradar varios xenobióticos modelo (incluyendo fenol, 2,4-

New designs for process optimization, development of new production fields, and providing advantages for environment preservation; 1.4) Improvement of conventional processes. Incorporation of already-known technologies improving process yield and selectivity; and 3.1) Improvement of product life cycle and properties. Process design to improve the quality of the final product. Analysis of parameters for quality improvement".

The main expected results are: a) Improvement of utilization of non-woody plants in order to obtain mainly paper pulp; b) Improvement of bleaching of non-woody pulps by less contaminating methods; c) Saving bleaching chemicals by the use of biotechnological methods without impairing pulp properties; d) Improvement of enzyme-mediator systems applied to commercial bleaching processes; e) Yield increase in relationship with raw material; and f) Better understanding of the mechanism of bleaching with non polluting methods.

Biodegradación de aromáticos contaminantes en suelo por *Pleurotus* especies

*Some basidiomycetous fungi are promising organisms for bioremediation applications due to the non-specific system they developed for depolymerization and mineralization of the complex and recalcitrant polymer of lignin. The use of these fungi for bioremediation of water and soil has been initiated in other countries. Recent experiments show that they are able to degrade aromatic compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and mixtures of different simple aromatic compound (BTEX). A significant progress in the understanding of the ligninolytic system in *Pleurotus* species was achieved in our laboratory during last years, including: characterization of the different enzymes, study of laccase-mediator systems for degradation of non-phenolic aromatic compounds, description of a new ligninolytic peroxidase, description of a cyclic system producing hydrogen peroxide, and demonstration of hydroxyl and superoxide radical formation by the fungi. Due to these facts, xenobiotic degradation by this fungus will be investigated in order to develop a bioremediation strategy for the removal of aromatic pollutants from soils of the Comunidad de Madrid. In the present study, the following aspects of xenobiotic degradation by *Pleurotus* spp will be studied: i) evaluation of the capabilities of this fungus to degrade different model xenobiotics (including phenol, 2,4-dichlorophenol, toluene and benzo(a)pyrene); ii) detailed study of the enzymatic system implicated in xenobiotic*

diclorofenol, tolueno y benzo(a)pireno); ii) el estudio detallado del sistema enzimático implicado en el proceso de biodegradación (incluyendo el papel de las enzimas oxidativas y sus posibles mediadores redox, los sistemas de reducción asociados al micelio y los mecanismos de generación de especies activas de oxígeno); y iii) la biorremediación de un suelo contaminado con objeto de evaluar la eficacia del hongo seleccionado para eliminar los xenobióticos y el destino de los diferentes metabolitos formados en las diferentes fracciones del suelo (validación en microcosmo).

degradation (including oxidative enzymes and their potential mediators, mycelium-associated reducing systems, and generation of active oxygen species); and iii) bioremediation of a contaminated soil to determine the efficiency of xenobiotic degradation by fungi and the fate of the metabolites formed in the different organic fractions of soil (microcosm validation).

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- CICYT-Biotecnología, BIO96-393 (1996-1999)
- CAM-Medio Ambiente, 07M/0051 (1998-2001)
- FEDER/CICYT-Medio Ambiente, 1FD97-0742 (1999-2001)
- FEDER/CICYT-Tecnologías Químicas, 2FD97-896-C02-02 (1999-2001)
- CICYT-Biotecnología, BIO99-908 (1999-2002)
- V Programa Marco de la UE-Agricultura Sostenible, QLK5-99-1357 (2000-2002)
- V Programa Marco de la UE-La Fábrica Celular, QLK3-99-590 (2000-2003)
- CAM-Contrato Programa-Genómica – Proteómica (2000-2003)

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- **Francisco Javier Ruiz Dueñas.** Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica. Universidad Complutense de Madrid, 1999. Director: Angel T. Martínez Ferrer.

Patente/*Patent*

- Martínez, M. J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Barrasa, J.M., Martínez-Iñigo, M.J., Romero, J., Canaval, J. y Martínez, A.T. (2000). Procedimiento de eliminación microbiana de compuestos lipofílicos en la fabricación de pasta de papel a partir de madera de frondosas. No. solicitud 200000018.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Böckle, B., Martínez, M.J., Guillén, F., and Martínez, A.T. (1999). Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 923-928.
- Camarero, S., Bocchini, P., Galletti, G.C., and Martínez, A.T. (1999). Py/GC/MS analysis of phenolic and etherified phenylpropanoid units in natural and industrial lignins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 630-636.
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1999). Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* **274**, 10324-10330.
- Carameo, L., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1999). A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving α -keto- γ -thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 916-922.
- Dorado, J., Almendros, G., Camarero, S., Martínez, A.T., Vares, T., and Hatakka, A. (1999). Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 605-612.
- George, E., Tamerler, C., Martínez, A.T., Martínez, M.J., and Keshavarz, T. (1999). Influence of growth medium composition on the lipolytic enzyme activity of *Ophiostoma piliferum* (Cartapip®). *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **74**, 137-140.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1999). Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* wood. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1367-1371.
- Martínez, A.T., Almendros, G., González-Vila, F.J., and Fründ, R. (1999). Solid-state spectroscopic analysis of lignins from several Austral hardwoods. *Solid State NMR* **15**, 41-48.
- Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Gutiérrez, A., del Río, J.C., and Martínez, A.T. (1999). Fungal screening for biological removal of extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. *Can. J. Bot.* **77**, 1513-1522.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1999). Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* **31**, 223-236.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F., Camarero, S., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1999). Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4458-4463.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1999). Heterologous expression of *Pleurotus eryngii* peroxidase confirms its ability to oxidize Mn²⁺ and different aromatic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4705-4707.
- Varela, E., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (1999). Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem. J.* **341**, 113-117.
- Camarero, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Sarkar, S., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2000). The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**, 37-43.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Muñoz, C., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2000). Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **382**, 142-147.
- Guillén, F., Muñoz, C., Gómez-Toribio, V., Martínez, A.T., and Martínez, A.T. (2000). Oxygen activation during the oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 170-175.
- Gutiérrez, A., Martínez, M.J., del Río, J.C., Romero, J., Canaval, J., Lenon, G., and Martínez, A.T. (2000). Fungal pretreatment of *Eucalyptus* wood can strongly decrease the amount of lipophilic extractives during chlorine-free kraft pulping. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3705-3709.
- Martínez-Iñigo, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2000). Time course of fungal removal of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. *J. Biotechnol.* **84**, 119-126.
- Palma, C., Martínez, A.T., Lema, J., and Martínez, M.J. (2000). Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: A comparison between *Bjerkandera* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **77**, 235-245.
- Saparrat, M.C.N., Martínez, M.J., Tourmier, H.A., Cabello, M.N., and Arambarri, A.M. (2000). Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrata. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**.
- Varela, E., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2000). Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidase genes in 30 fungal species. *J. Biotechnol.* **83**, 245-251.
- Varela, E., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2000). Aryl-alcohol oxidase protein sequence: A comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* **1481**, 202-208.
- Varela, E., Böckle, B., Romero, A., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2000). Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. *BBA Protein. Struct. Mol. Enzym.* **1476**, 129-138.

Bioquímica de Hongos Biochemistry of Fungi

CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigadora de Carrera / Staff Scientist

MONIQUE NOVAES-LEDIEU
Investigadora Emérita / Emeritus Scientist

AMELIA PÉREZ CABO
Doctora Vinculada / Associate

DOLORES BERNARDO LÓPEZ
B. Predoctoral / Graduate

ELOY BLANCO MARTÍNEZ
ROSA MARTÍNEZ DEL PUERTO
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Pared celular, *Agaricus bisporus*, *Verticillium fungicola*, fungicida, substratos de cultivo

Mecanismos celulares y moleculares del micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus* (champiñón cultivado)

La verticiliosis o "mole seca" de los cultivos de champiñón está producida por el hongo hifomiceto *Verticillium fungicola*, que parasita los carpóforos de *Agaricus bisporus* (hongo basidiomiceto), pero no su correspondiente micelio vegetativo. Estudios realizados en este laboratorio han puesto de manifiesto las diferentes composiciones y estructuras químicas de las paredes celulares de las hifas del micelio agregado de los carpóforos de *A. bisporus* y de las paredes del correspondiente micelio vegetativo. También hemos demostrado que *V. fungicola* sintetiza "in vitro" las enzimas necesarias para degradar ambas clases de paredes celulares, mientras que solo es capaz de digerir "in vivo" las paredes celulares de las hifas agregadas. En el momento actual estamos estudiando la interacción que

Keywords: Cell wall, *Agaricus bisporus*, *Verticillium fungicola*, fungicide, cultivation substrates

Cellular and molecular mechanisms of the *Verticillium fungicola* mycoparasitism on the *Agaricus bisporus* fruit bodies (cultivated mushroom)

The verticillium disease or "dry bubble" of the cultivated mushroom is caused by the fungus hyphomycete *Verticillium fungicola*, which parasitizes the *Agaricus bisporus* fruit bodies (fungus basidiomycete), but does not parasitize the corresponding vegetative mycelium. Studies carried out in this laboratory have shown the different hyphal wall chemical composition and structure of the *A. bisporus* fruit bodies aggregated mycelium and that of the vegetative mycelium. The necessary enzymes to degrade both kinds of *A. bisporus* cell walls are synthesized "in vitro" by *V. fungicola*, whereas the mycopathogen is only able to digest "in vivo" the hyphal walls of fruit bodies. At present we are studying the interaction produced between certain polysaccharides of the *V. fungicola* cell walls (glucogalactomannans) with determi-

se produce entre ciertos polisacáridos de las paredes celulares de *V. fungicola* (glucogalactomananos) con determinadas proteínas (glicoproteínas-lectinas) de las paredes celulares de las hifas de los carpóforos de *A. bisporus*, que podría ser la causa de la adhesión y/o el reconocimiento entre el micoparásito y el hospedador, mecanismos previos al desarrollo de la micosis.

Efecto del fungicida Prochloraz-Mn sobre las paredes celulares del micoparásito *Verticillium fungicola*

El fungicida Prochloraz-Mn es utilizado rutinariamente en los cultivos industriales de champiñón *Agaricus bisporus* para controlar la verticiliosis o "mole seca" producida por *Verticillium fungicola*, que ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en el sector. Nuestros estudios previos sobre los mecanismos celulares y moleculares de dicha patogénesis han mostrado el importante papel desempeñado por las paredes celulares tanto del micopatógeno (*V. fungicola*) como del hospedador (*A. bisporus*). Por todo ello y dado el uso intensivo del citado fungicida en los cultivos industriales de champiñón, el estudio del efecto que produce el Prochloraz-Mn sobre la estructura de las paredes celulares complementa los estudios que estamos llevando en paralelo para tratar de controlar la enfermedad. Resultados preliminares apuntan a la inhibición parcial de la síntesis de proteínas de las paredes celulares de *V. fungicola* junto con una modificación molecular de ciertos componentes polisacáridicos de estas mismas paredes celulares.

Caracterización de diferentes parámetros microbiológicos y bioquímicos como marcadores de la calidad de los substratos para el cultivo de hongos superiores comestibles

Los substratos sobre los que se desarrollan los hongos superiores comestibles están compuestos básicamente por subproductos lignocelulósicos, adicionados, en algunos casos, con otros componentes orgánicos más ricos en nitrógeno. Los substratos utilizados para el crecimiento de *Agaricus bisporus* (champiñón) requieren un proceso de compostaje o fermentación en estado sólido que tradicionalmente ha constado de una Fase I de fermentación libre y una Fase II de fermentación controlada. Cada una de estas fases debe

ned proteins (glycoproteins-lectins) in the hyphal walls of the *A. bisporus* fruit bodies, which could be the cause of the adhesion and/or recognition between the mycoparasite and the host, previous mechanisms to the mycosis development.

Effect of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell walls of the mycoparasite *Verticillium fungicola*

The fungicide Prochloraz-Mn is routinely used in industrial cultures of the mushroom *Agaricus bisporus* for controlling the verticillium disease or "dry bubble" produced by *Verticillium fungicola*, which produces heavy economic losses in the sector. Our preliminary studies on the cellular and molecular mechanisms of such pathogenesis have shown the important role played by not only the cell walls of the the mycopathogen (*V. fungicola*) but also by those of the host (*A. bisporus*). For this reason and due to the intensive use of the cited fungicide in the mushroom industrial cultures, the study of the effect produced by Prochloraz-Mn on the cell wall structure complements the studies carried out in parallel trying to control the disease. Preliminary results point out to a partial inhibition of cell wall protein synthesis in *V. fungicola*, as well as a modification of certain polysaccharide components in the same cell walls.

Characterization of different microbiological and biochemical parameters as quality markers of the substrates for edible higher fungi cultivation

The substrates for the cultivation of edible mushrooms are mainly composed of lignocellulosic by-products, in some cases activated with other richer nitrogenous components. The substrates for *Agaricus bisporus* (mushroom) cultivation require a composting or solid state fermentation process that traditionally has consisted of the Phase I of the free fermentation and the Phase II of the controlled fermentation. Each one of these two phases should show some microbiological and/or biochemical markers in order to supply repeatedly quality controlled substrates. As microbiological markers in Phase II we are evaluating mesophilic and thermophilic actinomycetes and fungi (particularly *Scytalidium thermophilum*), while in Phase I, as the fermentation conditions are not completely controlled, huge variations and consequently a very distinct aerobic fungal flora are shown. Among the biochemical markers, also in Phase II, we have selec-

contar con unos marcadores microbiológicos y/o bioquímicos con el fin de proporcionar unos substratos con una calidad contrastada y repetitiva. Como marcadores microbiológicos se están evaluando en la Fase II actinomicetos y hongos mesófilos y termófilos (particularmente *Scytalidium thermophilum*), dado que la Fase I, hasta que no se definan más completamente sus condiciones, presenta enormes variaciones y por ello una flora fúngica aerobia muy distinta. Entre los marcadores bioquímicos, igualmente de la Fase II, hemos seleccionado los constituyentes mayoritarios de la lignocelulosa: celulosa, hemicelulosa y lignina, así como sus correspondientes disacáridos de glucosa, xilosa y manosa (celobiosa, xilobiosa y manobiosa) y alcohol veratrílico, y las enzimas hidrolíticas celulosa, hemicelulosa y lacasa.

ted the lignocellulosic major components: cellulose, hemicellulose and lignine, as well as their corresponding disaccharides of glucose, xylose and mannose (cellobiose, xylobiose and manno- biose) and veratryl alcohol, and the hydrolytic enzymes cellula- se, hemicellulase and laccase.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB 96-0811 (1997-2000)
- Comunidad de Castilla-La Mancha, 143/CH-40 (1997-2000).
- CICYT-FEDER, I FD 97-1785 (2000-2001)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Bernardo, D., García Mendoza, C., Calonje, M., and Novaes-Ledieu, M. (1999). Chemical analysis of the lamella walls of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Curr. Microbiol.* 38, 364-367.
- Galán, B., García Mendoza, C., Calonje, M., and Novaes-Ledieu, M. (1999). Production, purification and properties of an endo-1,3-B-glucanase from the Basidiomycete *Agaricus bisporus*. *Curr. Microbiol.* 38, 190-193.
- Calonje, M., Novaes-Ledieu, M., Bernardo, D., Ahrazem, O., and García Mendoza, C. (2000). Chemical components and their locations in the *Verticillium fungicola* cell walls. *Can. J. Microbiol.* 46, 101-109.
- Calonje, M., García Mendoza, C., Pérez Cabo, A., Bernardo, D., and Novaes-Ledieu, M. (2000). Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 104, 988-992.
- García Mendoza, C. (2000). Algunos aspectos estructurales y funcionales de la pared celular de *Agaricus bisporus* y sus aplicaciones más inmediatas. *Anal. Real Acad. Farm.* 66, 5-22.

Virología en Acuicultura Virology in Fish-Aquaculture

SARA ISABEL PÉREZ PRIETO
Jefe de Grupo / Group Leader
M^a DEL CARMEN GUTIÉRREZ RUEDA
SYLVIA RODRÍGUEZ SAINT-JEAN
Investigadoras de Carrera / Staff Scientists

MARTA ALONSO FERNÁNDEZ (Hasta V-1999)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

ALVARO GÓMEZ GONZÁLEZ (Desde III-1999)
OLIVIA RODRÍGUEZ (Desde XI-1999)
B. Predoctorales / Graduate Students

LUIS MANUEL GUAYTA BENEIT
PILAR MARCILLA CAYANILLAS (Hasta XII-1999)
M^a MERCEDES SÁNCHEZ CARMONA
Personal Técnico / Technicians

Palabras clave: IPNV, IHNV, coinfecciones víricas, virus de salmónidos, interferencia vírica

Caracterización de coinfecciones virales en salmónidos y diseño de métodos inmunológicos y moleculares de diagnóstico

Nuestro laboratorio se ha centrado en estudios de caracterización de dos modelos de coinfecciones víricas heterólogas en Salmónidos que pueden producirse muy probablemente en nuestro país: El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en coinfección con el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) o con el rhabdovirus europeo de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). Hemos estudiado las propiedades antigénicas, moleculares y de virulencia de estas infecciones dobles y la existencia de interferencia mediada por virus. También estamos determinando la influencia de otros factores (temperatura, tiempo, multiplicidad de infección) sobre la patogénesis de la coinfección así como su importancia para la detección adecuada de los dos virus implicados. Hemos investigado la interferencia producida por el IPNV sobre la multiplicación del IHNV en la cepa S46, una coinfección aislada de trucha arco iris. Pases sucesivos de esta

Keywords: IPNV, IHNV, viral co-infections, salmonid fish viruses, viral interference

Characterization of viral co-infections in salmonid fish and design of immunological and molecular methods of diagnostic

Our laboratory focuses on the characterisation of two models of heterologous co-infections, in Salmonid fish both having the most probabilities to occur in our country: The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) mixed with the virus infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) or with the European rhabdovirus viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV). We are studying the antigenic, molecular and virulent properties of these dual infections, and the existence of viral intermediate interference. Several other factors (temperature, time, multiplicity of infection) affecting viral co-infection pathogenesis are being determined as well as their relevance for the detection of both of the involved viruses. We have investigated the interference of IHNV growth by the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in S46 strain, a co-infected isolate from rainbow trout. Successive passages of co-infected sample caused both a decrease in the IHNV mRNA and the absence of the PCR product specific for IHNV, confirming the loss of the virus. Flow cytometric analysis

muestra coinfectada produjeron una disminución del RNA mensajero del IHNV y la ausencia del producto de PCR específico del IHNV, confirmando así la pérdida de este virus. Los análisis de citometría de flujo indicaron que solo un 13% de las células inoculadas con la cepa S46 estaban infectadas con IHNV a las 48-72 horas post infección, frente a un 50-80 % de células positivas para el IPNV. La pre-exposición de las células al IHNV 24 horas antes de la infección con IPNV no modificó los títulos infectivos o los resultados de PCR obtenidos en coinfecciones simultáneas. Sin embargo no se produjo inhibición del IHNV cuando se redujo el inóculo del IPNV. Por tanto se demuestra que la interferencia del IPNV con el IHNV es dependiente de la multiplicidad de infección. La interacción fue específica para estos dos virus, ya que el IPNV no interfiere con el VHSV, un virus taxonómicamente próximo al IHNV.

El primer paso en una infección por virus es la adsorción del virus a un receptor específico en la membrana de la célula huésped susceptible. Nuestro grupo está estudiando actualmente la coinfección a nivel del anclaje de los virus para determinar una posible competencia del IPNV con el IHNV por los receptores celulares. Hemos establecido un ensayo que permite evaluar la adsorción mediante el uso de virus biotinado, por citometría de flujo. Los primeros resultados apuntan que IPNV no interfiere con IHNV a este nivel. También diseñamos un método de PCR anidada para detectar al IHNV en células coinfectadas a una multiplicidad de infección que fue 1000 veces menor que la del IPNV. Esta observación es importante ya que, hasta que los sistemas de vacunación mejoren, la detección adecuada de patógenos es el único modo efectivo de control de las infecciones virales en acuicultura.

Patogenicidad de serotipos españoles del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en trucha común (*Salmo trutta*, L.) y análisis de las proteínas relacionadas con la virulencia

El objetivo de este proyecto es el estudio de la virulencia de diversas cepas españolas de IPNV (aisladas originalmente en trucha arco-iris cultivada) para la especie autóctona de trucha común (*Salmo trutta*) y las diferencias entre las cepas de virus, a nivel molecular.

showed that only 13% of the cells inoculated with S46 strain were infected with IHNV at 48-72 hours post infection among the 50-80% positive cells for IPNV. Pre-exposure of cells to IHNV for 24 hours before infection with IPNV, did not affected the infective titers or the PCR results obtained in simultaneous co-infections. However inhibition of IHNV was not produced when the IPNV inoculum was reduced. So, a multiplicity of infection dependence was demonstrated for IPNV-IHNV interference. The interaction was specific for these two viruses, as the IPNV did not interfere with the VHSV, a virus taxonomically related with the IHNV.

The first step in virus infection is the attachment of the virus to a specific receptor on the surface of susceptible host cells. We are now studying the co-infection at the level of virus binding for determining a possible IPNV-IHNV competition for cellular receptors.

We have established a virus binding assay which directly visualized the binding of IHNV or IPNV to its target cells by using the biotinilated virus in flow cytometry. The first results suggest that IPNV do not interfere with IHNV at this level. We have also designed an improved method of nested-PCR for detecting the IHNV in co-infected cells at a multiplicity of infection that was 1000 times lower than that of IPNV. This observation is interesting as, until vaccine technology improves, the accurate detection of the pathogens is the only effective way to control virus infections in aquaculture.

Pathogenicity of spanish serotypes of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in brown trout (*Salmo trutta*, L.) and analysis of the proteins related to virulence

*The aim of this project is to study the virulence of several strains of IPNV (originally isolated from rainbow trout) to the autochthonous species brown trout (*Salmo trutta*) and the differences of viral strains at the molecular level.*

We have determined that 3-4 months of age is the time of maximum susceptibility for IPNV infection in brown trout, and the rates of mortality produced by ten viral isolates. The molecular changes in the non-conserved fragment of the viral protein gene VP2 and VP3 are being studied in relation to virulence. The comparison of the identified nucleotide and deduced amino acid sequences of non-virulent strains with the virulent Sp reference strain, revealed only five amino acid differences, all of the in the VP2 variable domain.

Hemos determinado que la edad de 3-4 meses es el momento de mayor susceptibilidad para la infección por IPNV en trucha común, y las tasas de mortalidad producidas por 10 aislados del virus. Se están estudiando las alteraciones moleculares en el fragmento no conservado del gen de las proteínas VP2 y VP3, y sus relaciones con la virulencia. La comparación de los nucleótidos identificados y la secuencias deducidas de aminoácidos de las cepas no virulentas con la cepa virulenta de referencia del serotipo Sp, revelaron únicamente cinco diferencias de aminoácidos, todos ellos en el dominio variable de la VP2.

Estamos llevando a cabo ensayos de atenuación de una cepa patógena y posteriormente realizaremos ensayos de mutagénesis dirigida para identificar las secuencias concretas involucradas en los cambios de patogeneidad.

Diseño de métodos inmunológicos y moleculares para el diagnóstico precoz de infecciones producidas por el virus de linfocistis en los cultivos de doradas (*Sparus aurata*, L)

De los resultados obtenidos en nuestro anterior proyecto se ha establecido que la dorada cultivada (*Sparus aurata*, L) sufre brotes epizooticos ocasionados por el iridovirus linfocistis (FDLV). Desafortunadamente no es posible detectar este virus por medio de las técnicas estándares de cultivo en líneas celulares establecidas previa a la aparición de los brotes. Por consiguiente, el objetivo prioritario para el Sector de acuicultura de la dorada es poseer técnicas fiables, sensibles, rápidas, fácilmente aplicables e incruentas que permitan la detección de la infección en estados asintomáticos previos a la aparición de los cuadros sindrómicos producidos por el FDLV.

En colaboración con el Dr Juan José Borrego (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga), en este proyecto estamos diseñando métodos diagnósticos basados en técnicas inmunológicas (ELISA, inmunoblot y citometría de flujo) y en técnicas moleculares (sondas DNA, hibridación DNA y PCR), para la detección precoz del FDLV. Disponemos de diferentes cepas de FDLV, de antisueros específicos y de una sonda de DNA que se obtuvieron como resultado del anterior proyecto. Las técnicas desarrolladas se aplicarán al diagnóstico de infecciones provocadas experimentalmente en peces sanos. En una segunda etapa se realizarán experimentos en las instalaciones de cultivo, para evaluar la eficacia de estas nuevas técnicas en la detección de portadores asintomáticos del virus.

We are developing assays of attenuation of a pathogenic strain and subsequent sequencing or site-directed mutagenesis to identify the exact sequences involved in antigenic variation and pathogenicity.

Design of immunological and molecular techniques for the diagnostic of lymphocystis virus infections affecting cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.)

From the results obtained in a previous project, we have established that cultured gilt-head seabream is susceptible to epizootic outbreaks provoked by an iridovirus, named fish lymphocystis disease virus (FDLV). Unfortunately, this FDLV can not be detected using standardised techniques of cell culture previous to the symptoms in the affected fish. Therefore, the design and development of sensitive, accurate, rapid, easily applicable and efficient techniques that allow the detection of these viruses in asymptomatic carrier fish previously to the appearance of infection signs, is priority for the fish farmers.

In collaboration with Dr Juan José Borrego (Department of Microbiology, Sciences, Málaga University), in the present project we are designing diagnostic methods based on immunological (ELISA, immunoblot and flow cytometry) and molecular (DNA probes, DNA hybridisation and PCR) techniques for the detection of FDLV affecting cultured gilt-head seabream. Specific antiserum of FDLV and a DNA probe obtained by our research team previously are available for their application. The new diagnostic techniques developed will be applied in experimental infections of FDLV in healthy fish specimens. In a second step, the techniques will be performed in fish farms to evaluate their efficiency in the detection of FDLV from asymptomatic carrier fish.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, 07B/0023/1998 (1999-2000)
- CICYT, AGF98-0837 (1998-2001)
- CICYT, MAR99-0609 (2000-2002)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Alonso, M., Rodríguez, S., and Pérez-Prieto, S.I. (1999). Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol. Methods*, 81, 1-9.
- Alonso, M., Rodríguez, S., and Pérez-Prieto, S.I. (1999). Viral coinfection in salmonids: infectious pancreatic necrosis virus interferes with infectious hematopoietic necrosis virus. *Arch. Virol.* 144, 1-17.
- García-Rosado, E., Castro, D., Rodríguez, S., Pérez-Prieto, S.I., and Borrego, J.J. (1999). Isolation and characterization of Lymphocystis virus (FLDV) from gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.) using a new homologous cell line. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19, 53-56.
- Pérez-Prieto, S.I., Rodríguez Saint-jean, S., García Rosado, E., Castro, D., Alvarez, M.C., and Borrego, J.J. (1999). Virus susceptibility of the fish cell line SAF-1 derived from gilt-head seabream. *Dis. Aquat. Organ.* 35, 149-153.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Borrego, J., Pérez Prieto, S.I. y Castro, D. (1999). Enfermedades virales que afectan a los cultivos piscícolas marinos. Métodos de inmunoprofilaxis. En: *Patología, Fisiología y Biotoxicología en especies acuáticas*. Sarasquete, González de Canales y Muñoz Cueto, eds. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Carbohidratos Microbianos

Microbial Carbohydrates

JUAN ANTONIO LEAL OJEDA
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

OUSSAMA AHRAZEM
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

MARÍA TERESA PEREYRA DE LA IGLESIA (HASTA IX-2000)
B. Predoctoral / Graduate Student

JESÚS LÓPEZ RAMÍREZ
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Polisacáridos, quimiotaxonomía, evolución de hongos, pared celular, antígenos

Polisacáridos FISS: Caracteres taxonómicos y evolutivos de los hongos

Los polisacáridos FISS constituyen el componente principal o único de la fracción soluble en agua obtenida de los extractos alcalinos de la pared celular de los hongos. La composición y estructura de estos polisacáridos es similar en todas las especies de un género bien delimitado. En los géneros heterogéneos se obtienen varios polisacáridos. Cada una de las diferentes estructuras es característica de un grupo de especies y se utiliza para establecer la relación de cada grupo con el género apropiado, como en *Penicillium vermoesenii* o *Myrothecium penicillioides*. Las diferencias entre estos polisacáridos aumentan con la distancia filogenética entre los géneros, ya que: "La naturaleza de estos polímeros en un hongo determinado no es caprichosa, sino que está relacionada con su posición taxonómica y refleja su historia evolutiva" (Bartnicki-García, 1987).

Se ha determinado la estructura de los polisacáridos FISS aislados de especies de *Paecilomyces* Sect. *Paecilomyces* y sus teleomorfos, que pertenecen a los géneros *Talaromyces*,

Keywords: Polysaccharides, chemotaxonomy, fungal evolution, cell wall, antigens

Polysaccharides FISS: Fungal taxonomic and evolutive characters

The polysaccharides FISS are the only or main components of the water soluble fraction obtained from alkali extractable material of the fungal cell wall. The composition and structure of these polysaccharides are similar in all the species of a well delimited genus. Several structures are obtained from heterogeneous genera. Each structure is characteristic of a group of species and it is used for establishing the relationship of a group of species with the appropriated genus, as *Penicillium vermoesenii* or *Myrothecium penicillioides*. The differences among these polysaccharides increase with the phylogenetic distance among the groups, since: "The nature of these polymers in any particular fungus is not capricious but is related to its taxonomic position and thus reflects its evolutionary history" (Bartnicki-García, 1987).

The polysaccharides FISS from species of *Paecilomyces* Sect. *Paecilomyces* and their teleomorphs, which belong to the genera *Talaromyces*, *Byssosclamyces* and *Thermoascus* have been characterized. These polysaccharides consist of a main chain of

Byssosclamyces y *Thermoascus*. Estos polisacáridos constan de una cadena principal formada por manopiranosas, parcialmente sustituida en O-2 por cadenas de galactofuranosa y manopiranosas que permiten diferenciar especies. Se obtuvieron anticuerpos policlonales con alta especificidad frente a cada uno de estos polisacáridos.

El polisacárido FISS de *Penicillium vermoesenii* Biourge (= *Gliocladium vermoesenii* (Biourge) Thom), microorganismo que produce una grave enfermedad vascular en diferentes especies de palmeras, es similar al encontrado en nuestro laboratorio en especies de *Fusarium*. Estos resultados, el tipo de enfermedad y otros caracteres, mostraron que este hongo no pertenece a los géneros *Penicillium* o *Gliocladium* sino al género *Fusarium*.

El polisacárido FISS de la mayoría de las especies de *Fusarium* y de su teleomorfo *Gibberella* consta de una cadena de galactofuranosa casi completamente ramificada en O-2 por residuos de glucopiranosas o cadenas cortas formadas por ácido glucurónico y manosa. El polisacárido FISS de tres especies cuya localización en este género es dudosa y de otras dos que han sido transferidas a otros géneros mostraron otras estructuras.

Entre las especies de *Myrothecium* estudiadas, se han encontrado cinco estructuras diferentes de polisacáridos FISS. Dos de estas estructuras, que son similares entre sí y a estructuras halladas en otros hongos Hypocreales, fueron las encontradas con mayor frecuencia. En dos especies se obtuvieron estructuras que no tienen relación con *Myrothecium* y en *M. penicillioides* se encontró un polisacárido similar al descrito en especies de *Talaromyces* que muestra que esta especie está mal clasificada y debe transferirse a *Talaromyces*.

Estos resultados confirman la utilidad de los polisacáridos para delimitar géneros, familias y órdenes. La evolución de la estructura de estos compuestos de unos grupos a otros es de gran ayuda para establecer la historia evolutiva de los hongos.

mannopyranose partially substituted at O-2 by chains of galactofuranose and mannopyranose, which are useful for species differentiation. Highly specific polyclonal antibodies were raised against each one of these polysaccharides.

The polysaccharide FISS from Penicillium vermoesenii Biourge (=Gliocladium vermoesenii (Biourge) Thom), microorganism which produces a serious vascular disease on palm trees, is similar to the polysaccharide found by us in species of Fusarium. These results, the plant disease and other characters, revealed that this fungus does not belong to the genera Penicillium or Gliocladium and should be transferred to Fusarium.

The polysaccharide FISS from most species of Fusarium and its teleomorph Gibberella consists of a chain of galactofuranose almost fully branched at O-2 by either glucopyranose residues or short chains containing glucuronic acid and mannose. The polysaccharide FISS from three species, doubtfully assigned to this genus, and from other two which have been transferred to other genera, showed different structures. Among the species of Myrothecium studied, five different polysaccharides FISS were found. In two species, polysaccharides are not related to those of Myrothecium and the polysaccharide of M. penicillioides is similar to that found in species of Talaromyces, which shows that this Myrothecium species is misplaced and should be transferred to Talaromyces.

These results confirm the usefulness of the polysaccharides to delimit genera, families and orders. The evolution of their structure from group to group is of great help for establishing the evolutionary history of the fungi.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB 95 0078 CO2 01 (1997-1999)
- PETRI, 95 0247 OP (1998-2000)
- ABELLÓ (1999-2001)
- DGICYT, BQU-2000-1501-C02-01 (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **María Teresa Pereyra de la Iglesia.** Polisacáridos de líquenes: Aplicación en sistemática y variaciones estacionales. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Directores: Dr. J. Antonio Leal Ojeda y Dr. Carlos Vicente Córdoba.

Publicaciones/Publications**Artículos en Revistas/Journal Articles**

- Ahrazem, O., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., Barasoain, I., Bernabé, M., and Leal, J.A. (1999). Structural characterisation of a cell wall polysaccharide from *Penicillium vermoesenii*: chemotaxonomic application. *Can. J. Bot.* **77**, 961-968.
- Domenech J., Prieto, A. Barasoain, I., Gómez-Miranda, B., Bernabé, M., and Leal J.A. (1999). Galactomannans from the cell wall of species of *Paecilomyces* sect. *Paecilomyces* and their teleomorphs as chemotaxonomic markers. *Microbiology.* **145**, 2789-2796.
- Ahrazem, O., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., Barasoain, I., Bernabé, M., and Leal, J.A. (2000). A characteristic water-soluble cell wall polysaccharide for *Fusarium* and *Gibberella* species. *Mycol. Res.* **104**, 603-610.
- Ahrazem, O., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., Bernabé, M., and Leal, J.A. (2000). Heterogeneity of the genus *Myrothecium* as revealed by cell wall polysaccharides. *Arch. Microbiol.* **103**, 296-302.
- Calonje, M., Novaes-Ledieu, M. Bernardo, D., Ahrazem, O., and García Mendoza, C. (2000). Chemical Components and their locations in *Verticillium fungicola* cell wall. *Can. J. Microbiol.* **46**, 101-109.
- Santos, A., Marquina, D., Leal, J.A., and Peinado J.M. (2000). b-(1-6)-D-Glucan as Cell Wall Receptor for *Pichia membranifaciens* Killer Toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1809-1813.

Genética Bacteriana Bacterial Genetics

RUBENS LÓPEZ GARCÍA

Jefe de Grupo/Group Leader

PEDRO GARCÍA GONZÁLEZ

ERNESTO GARCÍA LÓPEZ

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

EMMANUEL GINDREAU (Hasta IX-1999)

Investigador Visitante / Visiting Scientist

ANTONIO CEBRIÁ GÓMEZ (Hasta VII-2000)

B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

DANIEL LLULL PEÑALBA

BLANCA DE LAS RIVAS GONZÁLEZ DEL REY

VIRGINIA OBREGÓN SÁNCHEZ

CRISTINA MOLDES TABARÉS (Desde III-2000)

B. Predoctorales / Graduate Students

ELOÍSA CANO CONGOSTO

MANUEL CARRASCO FERNÁNDEZ

Personal Técnico / Technicians



Palabras clave: Neumococo, cápsula, bacteriófagos, enzimas liticas

Estudios moleculares de factores de patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae*: cápsulas, bacteriófagos y proteínas de unión a colina

Las aportaciones científicas de nuestro grupo en el bienio que se analiza en esta Memoria se resumen así:

a.- Es bien sabido que el polisacárido capsular de neumococo es el principal responsable de la virulencia de este patógeno humano. Durante el desarrollo de este proyecto se ha caracterizado la estructura molecular del "cluster" que codifica el polisacárido capsular de los serotipos 33F y 37 de *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, este último resultó ser un "cluster" inactivo. Todo ello nos llevó a buscar y a iden-

Keywords: *Pneumococcus*, capsule, bacteriophages, lytic enzymes

Molecular studies on virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*: capsules, bacteriophages, and choline-binding proteins

The main achievements of our work during the biennial period analysed in this Memoir are summarized as follows:

a.- It is well known that capsular polysaccharides of pneumococcus are the main responsible for virulence of this important human pathogen. We have characterized the molecular structure of the cluster coding for the capsule serotypes 33F and 37 of *Streptococcus pneumoniae*. However, the cluster 37 turned out to be functionally inactive which led us to look for alternative genes coding for the type 37 capsule and we concluded that the synthesis of this capsular type was driven exclusively by a single gene

tificar un gen (*tts*) que es el único necesario y suficiente para la formación de la cápsula en el serotipo clínico 37. Asimismo, se ha demostrado que el serotipo 37 posee una gran estabilidad genética y que todos los clones estudiados hasta hoy derivan de un único clon aislado en 1939 que se ha extendido por varios continentes.

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto el polimorfismo que caracteriza a *galU*, un gen que juega un papel fundamental en la formación de todos los tipos capsulares caracterizados hasta el momento. Por ello, *galU* es una posible diana en el diseño futuro de nuevos antimicrobianos para combatir a neumococo. Finalmente, se ha caracterizado el "cluster" capsular del tipo 8 y la UDP-glucuronato epimerasa necesaria para la biosíntesis capsular del serotipo 1.

b.- Nuestro trabajo sobre mureín-hidrolasas, enzimas presentes en todos los microorganismos bien diferenciados taxonómicamente, ha dado como resultado la caracterización de la primera lisozima de *S. pneumoniae* que, además, se comporta como una autolisina cuando se incuba a 30°C, una temperatura próxima a la que existe en las vías altas del sistema respiratorio humano, lo que sugiere un papel biológico de esta enzima en el hábitat natural de neumococo. Asimismo, queremos destacar la caracterización preliminar de *LytB*, una mureín-hidrolasa que es fundamental para la separación de las células hijas al final de la división celular.

c.- Se ha documentado en la literatura reciente la elevada presencia de fagos atemperados en aislados clínicos de *S. pneumoniae* (hasta un 78%). Estas observaciones nos han llevado a proponer la conveniencia de analizar en detalle las características moleculares de fagos atemperados de esta especie. Como resultado de este trabajo cabe destacar el aislamiento de un nuevo fago atemperado (MM1) a partir de una cepa del serotipo 23F, un clon epidémico multirresistente a los antibióticos, y se ha caracterizado por vez primera el sistema de integración de un fago de neumococo. Una vez completada la secuencia del genoma de MM1 se está analizando el mecanismo de empaquetamiento del DNA en las cápsidas de MM1.

Neumococos atípicos: implicaciones clínicas y bases moleculares de sus características diferenciales

Durante los dos años de duración de este proyecto se han

named *tts*. In addition, we have proven that serotype 37 exhibits a remarkable genetic stability in all the clones identified so far. Currently, we have demonstrated a noticeable polymorphism for the *galU* gene coding for a UDP-glucose pyrophosphorylase required for capsular synthesis of almost all the capsules of pneumococcus. This peculiarity suggests that *GalU* could be an important target for the design of future antimicrobials. We have also characterized the capsular cluster coding for serotype 8, and, for the first time, an UDP-galacturonate epimerase required for the synthesis of the capsule of serotype 1.

b.- Murein-hydrolases are ubiquitous enzymes that have been identified in all well-characterized microorganisms. We have now reported the first lysozyme of *S. pneumoniae* named *LytC*, that behaves as an autolysin when incubated at 30°C, a temperature that is close to that found in the upper respiratory tract in humans. This suggests an important role of this enzyme in the natural habitat of pneumococcus. We have also preliminary characterized another murein hydrolase designed as *LytB*, an enzyme that appears to play a fundamental role in daughter cell separation at the final step of cell division, a process considered as basic for the spreading of the pathogenic species during infection.

c.- It has been documented in the recent literature the high incidence of lysogens in clinical strains of *S. pneumoniae* (up to 78%). This observation has alerted us on the importance of studying the molecular characteristics of temperate bacteriophages. As a result of this effort we have isolated and purified a new temperate phage designed as MM1. This phage was isolated from a serotype 23F strain an epidemic, multiresistant clone that has spread out by several continents. We have characterized for the first time the integration system of a pneumococcal phage and we have completed the entire nucleotide sequence of the genome of MM1. We are currently studying the peculiar mechanism of MM1 DNA packaging.

Atypical pneumococci: Clinical consequences and molecular basis of their peculiar characteristics

The major goals during the two-years long period projected for this work are as follows:

a.- A large number of atypical pneumococci (strains resistant to lysis by sodium deoxycholate) have been isolated in the laboratory of Dr. Julio Casal, codirector of this project. Seventeen of

conseguído los siguientes objetivos:

a.- Se ha aislado un gran número de cepas atípicas de neumococo (resistentes a la lisis por desoxicolato sódico), en el laboratorio del Dr. Julio Casal con quien compartimos este proyecto. Diecisiete de estos aislados clínicos han sido estudiados en detalle hasta el momento; se han clonado y secuenciado tres alelos del gen *lytA* que codifica la principal autolisina de neumococo. De estos resultados se ha podido concluir que la delección de dos aminoácidos del motivo P6 del dominio de reconocimiento del sustrato desempeña un importante papel en la manifestación del fenotipo de resistencia a desoxicolato.

b.- Se han clonado y expresado en *Escherichia coli* tres alelos del gen *lytA* aislados de cepas atípicas. Las proteínas LytA obtenidas con este procedimiento mostraban una gran sensibilidad a desoxicolato sódico cuando se ensayaban frente a paredes celulares de neumococo. Asimismo, se han diseñado dos genes quiméricos que contienen las regiones codificantes para el dominio N- o el C-terminal de LytA de la cepa salvaje intercambiado con el C- o el N-terminal, respectivamente, de la LytA de una cepa atípica. El análisis de las características bioquímicas de las enzimas expresadas a partir de estos genes quiméricos ha corroborado la influencia fundamental que ejerce un dominio C-terminal alterado a la hora de dar lugar a un fenotipo atípico.

Desarrollo de nuevos sistemas para la producción de proteínas de fusión por fermentación

Se han comenzado a desarrollar dos nuevos sistemas de expresión de proteínas de fusión basados en la utilización de dos dominios funcionales. El primero de ellos consiste en utilizar el dominio de unión a colina (ChBD) presente en algunas proteínas de la envuelta celular de neumococo, que permite la purificación de las proteínas de fusión en un único paso mediante cromatografía en DEAE-celulosa. Con el ChBD estamos construyendo vectores para la producción de proteínas de fusión intracelulares o secretables en *E. coli* y en la levadura *Pichia pastoris*. El segundo sistema es un nuevo método de fusión basado en el empleo de las fasinias, proteínas que se pueden unir específicamente a los gránulos de bioplásticos (PHA) que producen de forma natural algunas bac-

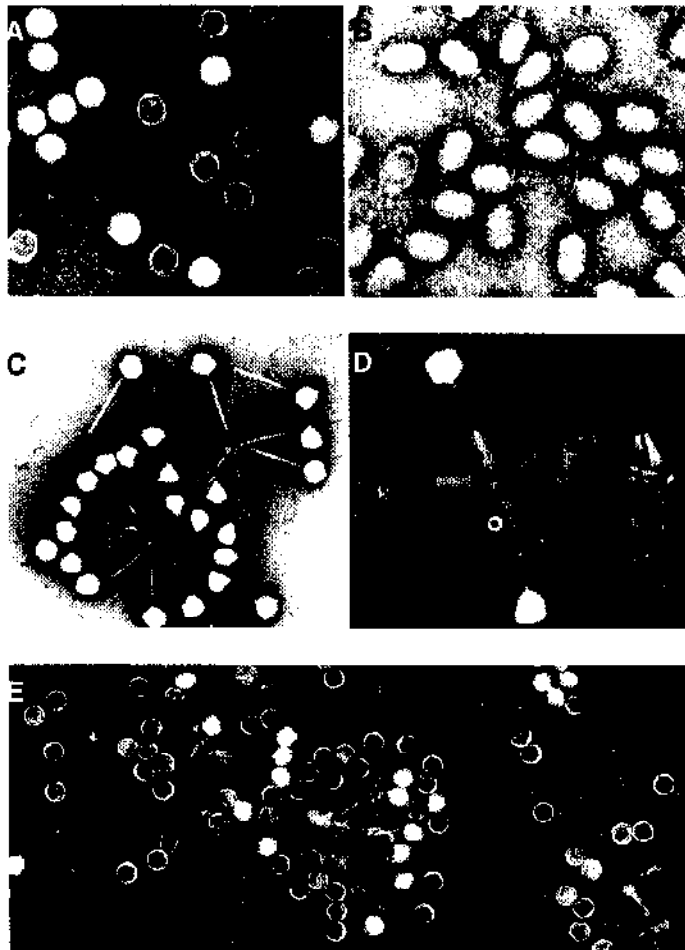
*these isolates have been studied in detail and three alleles of the *lytA* gene, coding for the major autolytic enzyme of this species, have been isolated, cloned, and sequenced. From these results we have concluded that a two amino acid-deletion detected in the motif P6 is an important requirement to produce a phenotype sensitive to sodium deoxycholate.*

*b.- Three *lytA* genes prepared from atypical pneumococci have been cloned and expressed in Escherichia coli. The protein purified from these recombinant strains exhibited a noticeable sensitivity to sodium deoxycholate when they were tested on isolated pneumococcal cell walls using an in vitro assay. Furthermore, we have constructed, cloned and expressed in E. coli two functional chimeric enzymes built up by the N- or the C-terminal domains of the wild type *lytA* gene and the C- or N-terminal of an atypical *lytA* gene, respectively. The biochemical analysis of the enzymes purified from E. coli strains have confirmed and extended our observations on the fundamental role played by an altered C-terminal domain to determine the characteristic atypical phenotype.*

Developing of new systems for producing fusion proteins by fermentation

We are developing two new systems to express fusion proteins based on two functional domains. The first one utilizes the choline binding domain (ChBD) present in some proteins of the pneumococcal cellular envelope, which allows the purification of the fusion proteins in a single step through DEAE-cellulose chromatography. With such ChBD we are constructing vectors for producing intracellular or secretable fusion proteins in E. coli or Pichia pastoris. The other system is a new method based on phasins, proteins capable to specifically bind to bioplastic granules (PHA) which are produced by certain bacteria like Pseudomonas. These PHA granules can be separated using standard centrifugation techniques which would permit the scaling up at the industrial level.

terias como *Pseudomonas*. Estos gránulos de PHA se pueden separar mediante sencillas técnicas de centrifugación lo que podría permitir su desarrollo industrial a gran escala.



Micrografías electrónicas de bacteriófagos de neumococo: Dp-1 (A); Cp-1 (B); HB-3 (C); EJ-1 (D) y MMI (E).
Electronic micrographs of several pneumococcal phages.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MC, PB96-0809 (1997-2000)
- CAM, 08-2/0014/98 (1998-2000)
- Fundación Ramón Areces (2000-2002)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Daniel Lluís Peñalba. Caracterización de un nuevo locus capsular de *Streptococcus pneumoniae*. Universidad de Alcalá de Henares, 2000. Director: E. García López y R. Muñoz Moreno.

Publicaciones/Publications**Artículos en Revistas/Journal Articles**

- García, P. González, M^a P. García, E., López, R., and García, J. L. (1999). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* 31, 1275-1277.
- García, P. González, M^a P. García, E., García, J. L., and López, R. (1999). The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* 33, 128-138.
- García, E., Lluís, D., and López, R. (1999). Functional organization of the gene cluster involved in the synthesis of the pneumococcal capsule. *Internatl. Microbiol.* 2, 169-176.
- Lluís, D., Muñoz, R., López, R., and García, E. (1999). A single gene (*tts*) located outside the *cap* locus directs the formation of *Streptococcus pneumoniae* type 37 capsular polysaccharide: type 37 pneumococci are natural, genetically binary strains. *J. Exp. Med.* 190, 241-251.
- López, R., and García, E. (1999). Basic research and the challenges of microbiology for the 21st century. *Internatl. Microbiol.* 2, 59-60.
- Muñoz, R., López, R., and García, E. (1999). Construction of a new *Streptococcus pneumoniae*-*Escherichia coli* shuttle vector based on the replicon of an indigenous pneumococcal cryptic plasmid. *Internatl. Microbiol.* 2, 23-28.
- Muñoz, R., López, R., de Frutos, M., and García, E. (1999). First molecular characterization of a uridine diphosphate galacturonate 4 epimerase: an enzyme required for capsular biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Mol. Microbiol.* 31, 703-713.
- Muñoz, R., Mollerach, M., López, R., and García, E. (1999). Characterization of the type 8 capsular gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 181, 6214-6219.
- García, E., Lluís, D., Muñoz, R., Mollerach, M., and López, R. (2000). Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Res. Microbiol.* 151, 429-435.
- Gindreau, E., López, R., and García, P. (2000). MM1, a temperate bacteriophage of the type 23F Spanish/American multiresistant epidemic clone of *Streptococcus pneumoniae*: Structural analysis of the site-specific integration system. *J. Virol.* 74, 7803-7813.
- López, R., González, M^a P., García, E., García, J. L., and García, P. (2000). Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res. Microbiol.* 151, 437-443.
- Lluís, D., López, R., and García, E. (2000). Clonal origin of the type 37 *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Res.* 6, 269-275.
- Mollerach, M., and García, E. (2000). The *galU* gene of *Streptococcus pneumoniae* that codes for a UDP-glucose pyrophosphorylase is highly polymorphic and suitable for molecular typing and phylogenetic studies. *Gene* 260, 77-86.
- Varea, J., Saiz, J. L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Medrano, F. J., Arrondo, J. L., Iloro, I., Laynez, J., García, J. L., and Menéndez, M. (2000). Do sequence repeats play an equivalent role in the choline-binding module of pneumococcal LytA amidase? *J. Biol. Chem.* 275, 26842-26855.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- López, R., and García, E. (1999). El reto de la Microbiología ante el siglo XXI. En: *Antimicrobianos en Medicina*, E. García, R. López, and J. Prieto, eds. (Prous Science, Barcelona, Spain) pp. 1-7.
- De la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A., and Muñoz, R. (2000). Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity, and quinolone-resistance. En: *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology Mechanisms of Disease*. A. Tomasz, ed. (Mary Ann Liebert, Inc. Pub, Larchmont, NY) pp. 381-397.
- García, E., Arrecubieta, C., Muñoz, R., Mollerach, M., and López, R. (2000). A functional analysis of the genes involved in the synthesis of type 1 and type 3 capsular polysaccharides. *Streptococcus pneumoniae*. En: *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanism of Disease*. A. Tomasz, ed. (Mary Ann Liebert, Inc. Pub, Larchmont, NY) pp. 139-154.
- García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., Medrano, F.J., and López, R. (2000). Versatility of choline-binding domain. En: *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. A. Tomasz, ed. (Mary Ann Liebert, Inc. Pub, Larchmont, NY) pp. 231-244.
- García, P., Martín, A.C., and López, R. (2000). Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*: A molecular approach. En: *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. A. Tomasz, ed. (Mary Ann Liebert, Inc. Pub, Larchmont, NY) pp. 211-222.
- López, R., García, E., García, P., and García, J.L. (2000). The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? En: *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. A. Tomasz, ed. (Mary Ann Liebert, Inc. Pub, Larchmont, NY) pp. 197-209.

Biotecnología Medioambiental

Environmental Biotechnology

JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ

Jefe de Grupo/Group Leader

EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

M^a JOSÉ HENAEZ SILVA

M^a AUXILIADORA PRIETO JIMÉNEZ

Investigadoras Contratadas / Research Associates

ISABEL DE LA MATA

VICTORIA EUGENIA SANTOS

Investigadoras Visitantes / Visiting Scientists

ABEL FERRÁNDEZ BARCA

B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

BEATRIZ GALÁN SICILIA

BEGOÑA TORRES BELINCHÓN

B. Predoctorales / Graduate Students

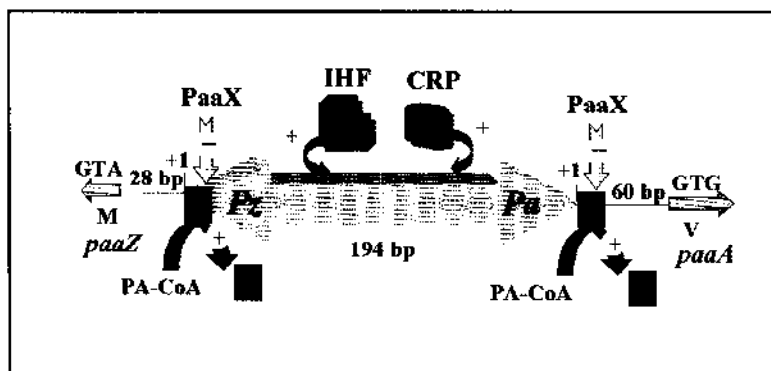


Figura: Esquema del circuito regulador de la expresión génica de los operones divergentes responsables del catabolismo del ácido fenilacético en *Escherichia coli*.

Figure: Scheme of the regulatory circuit driving the expression of the divergent operons responsible for the catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*.

Palabras clave: Biodegradación, biotransformación, compuestos aromáticos, contención, bioplásticos

Caracterización de rutas catabólicas de compuestos aromáticos

Nuestro grupo ha caracterizado a nivel molecular los genes catabólicos y reguladores responsables de la degradación en *Escherichia coli* de distintos compuestos aromáticos como los ácidos fenilpropiónico (PP), 3-hidroxifenilpropiónico (3HPP), fenilacético (PA), 3- y 4-hidroxifenilacético (HPA), y las correspondientes aminas del PA y HPA, i.e., feniletilamina y tiramina. Durante los dos años que abarca la presente Memoria, se han estudiado los mecanismos moleculares que controlan la expresión de los genes responsables del catabolismo de PA (*paa*), HPA (*hpa*) y 3HPP (*mhp*). Se han caracterizado las interacciones de las proteínas reguladoras PaaX (repressor), HpaR (repressor), y MhpR (activador) con los correspondientes promotores regulados, y se ha analizado el perfil de inductores en cada caso. Además de la regulación específica de las rutas *paa*, *hpa* y *mhp* debida a las proteínas PaaX, HpaR y MhpR, respectivamente, existe una regulación superimpuesta que está mediada por reguladores globales de *E. coli* tales como la proteína IHF (factor de integración del huésped) y CRP (proteína receptora de cAMP), y que permite ajustar la transcripción de los genes catabólicos al estado fisiológico y a las fuentes de carbono (efecto de represión por glucosa) disponibles para las células en cada momento. Se ha caracterizado también un transportador de 3HPP, la proteína MhpT, que permite la inducción de los genes *mhp* a bajas concentraciones de dicho aromático.

Por lo que respecta a los aspectos bioquímicos del catabolismo de compuestos aromáticos en *E. coli*, se ha caracterizado el componente reductasa (HpaC) de la proteína de dos componentes HpaBC que transforma HPA en 3,4-dihidroxifenilacetato durante la primera etapa de degradación de HPA. HpaC constituye el prototipo de una nueva subfamilia de flavin:NAD(P)H reductasas. También se ha identificado la oxigenasa multicomponente PaaABCDE que hidroxila PA-CoA durante la segunda etapa de degradación de PA a través de una peculiar ruta aeróbica híbrida.

Referente a la degradación de compuestos aromáticos en otras bacterias, hemos construido cassettes de DNA con los genes *sty* de *Pseudomonas sp.* Y2 responsables de la transfor-

Keywords: Biodegradation, biotransformation, aromatic compounds, containment, bioplastics

Characterization of aromatic catabolic pathways

We have characterized at the molecular level the catabolic and regulatory genes responsible for the degradation in *Escherichia coli* of different aromatic compounds such as the phenylpropionic acid (PP), 3-hydroxyphenylpropionic acid (3HPP), phenylacetic acid (PA), 3- and 4-hydroxyphenylacetic acid (HPA), and the corresponding amines of PA and HPA, i.e., phenylethylamine and tyramine, respectively. During the biennial period recorded by this Memoir we have studied the molecular mechanisms controlling the expression of the genes responsible for the catabolism of PA (*paa*), HPA (*hpa*), and 3HPP (*mhp*). The interactions between the regulatory proteins PaaX (repressor), HpaR (repressor) and MhpR (activator), with the cognate promoters have been characterized, and the effector profile of each regulator was determined. Superimposed to the specific regulation for the *paa*, *hpa*, and *mhp* genes mediated by the PaaX, HpaR, and MhpR regulators, respectively, some global regulators such as the IHF (integration host factor) and CRP (cAMP receptor protein) proteins mediate a higher level of regulation. This superimposed regulation may adjust the transcriptional output from the catabolic promoters to the overall growth status of the cell. A specific transport protein (MhpT) for the uptake of 3HPP has been also characterized and it allows induction of the *mhp* genes at low concentrations of 3HPP.

From a biochemical point of view, we have characterized the reductase component (HpaC) of the two-component protein HpaBC which transforms HPA into 3,4-dihydroxyphenylacetate during the first enzymatic step of HPA catabolism in *E. coli*. The HpaC protein becomes the prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. Moreover, we have identified the PaaABCDE multicomponent oxygenase that hydroxylates PA-CoA during the second enzymatic step in the PA aerobic hybrid pathway.

Regarding to the degradation of aromatic compounds in bacteria other than *E. coli*, we have engineered DNA cassettes harboring the *sty* genes from *Pseudomonas sp.* Y2 which are responsible of the conversion of styrene into PA. These cassettes have been used to expand the catabolic abilities of different PA degraders, such as *E. coli* and *Pseudomonas* strains, for styrene removal. The expression of the *sty* genes is controlled at the transcrip-

mación de estireno a PA. Estas cassettes se han utilizado para expandir la capacidad catabólica de otros organismos degradadores de PA tales como *E. coli* y distintas cepas de *Pseudomonas*, que así son capaces de eliminar un tóxico tan importante como el estireno. Asimismo, se están realizando estudios sobre el mecanismo de regulación transcripcional de los genes *sty* mediado por el sistema regulador de dos componentes StySR.

Finalmente, se han iniciado los estudios de dos nuevas rutas centrales de degradación de compuestos aromáticos, la ruta del gentisato de *Salmonella typhimurium* y la ruta del homogentisato de *P. putida*.

Distintos aspectos bioquímicos y genéticos de todas estas rutas así como sus aplicaciones biotecnológicas serán objeto de estudio durante los próximos años.

Biodesulfuración de petróleo

Para combatir el grave problema de la lluvia ácida ocasionado, en gran medida, por la oxidación del azufre presente en los combustibles fósiles, se requiere una reducción significativa en su contenido en azufre orgánico. Una estrategia alternativa al proceso químico de hidrodesulfuración es la utilización de microorganismos capaces de eliminar selectivamente el azufre orgánico del crudo (biodesulfuración). Los compuestos más difíciles de desulfurar por el proceso químico de la hidrodesulfuración son los aromáticos, por lo que se ha utilizado el dibenzotiofeno (DBT) como la molécula modelo en biodesulfuración. Nuestro grupo ha clonado y expresado los genes *dszABC* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, responsables de la desulfuración de DBT, en organismos heterólogos. Cepas recombinantes de *P. putida* portadoras de los genes *dsz* son capaces de desulfurar DBT tanto en crecimiento como en estado de reposo con mayor eficacia y rapidez que la cepa parental IGTS8. Estos biocatalizadores se han mejorado significativamente expresando la flavín reductasa HpaC de *E. coli* (ver más arriba), una actividad necesaria para aportar el suficiente poder reductor para la oxigenación del DBT por las monooxigenasas DszC y DszA. La combinación de los genes *dszABC* y *hpaC* en una cassette de DNA permite analizar la capacidad que presentan distintos microorganismos para desulfurar DBT. El papel de la desulfinasas DszC como enzima clave del proceso se está investigando actualmente. Dado que

tional level by StySR two-component regulatory system, and the molecular basis of this regulatory circuit is under study.

Finally, we are studying two new central pathways for the catabolism of aromatic compounds, the gentisate pathway from *Salmonella typhimurium* and the homogentisate pathway from *P. putida*.

Several biochemical and genetic aspects of all these routes as well as their biotechnological applications will be subject of research during the next years.

Biodesulfurization Of Oil

The acid rain is an environmental problem caused, mainly, by the oxidation of the sulfur present in fossil fuels. To limit the sulfur-related air pollution, environmental restrictions on the sulfur content of fossil fuels are increasingly stringent. An alternative strategy to the conventional hydrodesulfurization process (chemical process) is the utilization of microorganisms able to selectively remove the organic sulfur present in oil (biodesulfurization). Since the sulphur-containing aromatic compounds are the most refractory to current hydrodesulfurization, dibenzothiophene (DBT) has been used as the model compound in biodesulfurization. We have cloned and expressed in heterologous hosts the *dsz* genes from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 responsible for DBT desulfurization. Recombinant *P. putida* strains expressing the *dsz* genes are able to desulfurize DBT both in growing and in resting state with higher efficiency than the parental IGTS8 strain. These biocatalyzers have been improved by cloning and expressing the *hpaC* gene from *E. coli* which encodes a flavin reductase (see above) that supplies the required FMNH₂ for the DszC and DszA-mediated DBT oxygenation. The *hpaC* and *dszABC* genes have been engineered in a mobilizable DNA cassette that can be used to check the biodesulfurization potential in a wide variety of bacteria. The role of the DszC desulfinase as the bottleneck of the desulfurization reaction is under investigation. Since biodesulfurization of petroleum is a process of high industrial interest, we are collaborating with oil companies to develop more efficient and robust biocatalyzers.

Bioplastics

Bioplastics or polyhydroxyalkanoates (PHA) are bacterial storage compounds that are synthesized and accumulated intra-

el proceso de biodesulfuración constituye un tema de gran interés biotecnológico, se han establecido colaboraciones con empresas petrolíferas con el objeto de mejorar los biocatalizadores actuales para su utilización en bioreactores.

Bioplásticos

Los polímeros conocidos como bioplásticos o polihidroxicanoatos (PHA) son producidos y acumulados en forma de gránulos de reserva en el interior celular de ciertas bacterias cuando las condiciones de cultivo no son óptimas para el crecimiento. En general, los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster biodegradable (93-97% del peso seco del gránulo (PSG)) rodeado por una monocapa fosfolipídica (1-6% del PSG) y proteínas asociadas al gránulo (GAPs) (1-2% del PSG), las cuales forman una fina capa en su superficie. Hasta el momento se han definido tres clases de GAPs en bacterias: i) las PHA sintetasas, que llevan a cabo la polimerización del PHA, ii) las PHA despolimerasas, responsables de la degradación del bioplástico y iii) las fasininas que generalmente son el componente principal de las GAPs. Las fasininas han sido identificadas en varios microorganismos y se cree que forman una capa proteica en la superficie del gránulo, generando una interfase entre el citoplasma celular (ambiente hidrofílico) y el núcleo hidrofóbico del gránulo de PHA. Además de esta función estructural, algunas fasininas poseen otras funciones relacionadas con la biosíntesis del PHA. *Pseudomonas oleovorans* produce mayoritariamente dos proteínas asociadas al gránulo de PHA, las fasininas PhaF y PhaI. Del análisis de la secuencia de aminoácidos de la fasinina PhaF se deduce que esta proteína está estructurada en dos dominios: la región C-terminal, similar a las proteínas de tipo histona, y el extremo N-terminal, que presenta 57% de similitud con la secuencia de aminoácidos completa de la fasinina PhaI (15,4 kDa) y es el responsable de la unión al gránulo. Los genes *pha* de *P. oleovorans* han sido clonados y expresados en huéspedes heterólogos como *E. coli* y se ha conseguido la síntesis de plásticos en dichos biocatalizadores recombinantes. Además, el dominio N-terminal de PhaF se está utilizando con gran éxito para su fusión a proteínas de interés industrial sin que por ello pierda la capacidad de unión al gránulo. La posibilidad de separar los gránulos de PHA mediante sencillas técnicas de centrifugación, ya puestas a punto para la pro-

cellularly in the form of inclusion bodies (granules) when the bacteria face non-optimal growth conditions. The PHA granules consist of a biodegradable polyester (93-97% of the granule dry weight) surrounded by a monolayer of phospholipids (1-6% of the granule dry weight) and some granule associated proteins (GAPs) that amount up to 1-2% of the granule dry weight. Up to now, there are three types of GAPs in bacteria: i) the PHA synthetases that synthesize the PHA, ii) the PHA depolymerases that degrade the bioplastic, and iii) the phasins that are the major component of the GAPs. Phasins have been identified in several microorganisms and they are thought to cover the surface of the granule becoming an interphase between the cytoplasm (hydrophilic) and the hydrophobic core of the granule. In addition to the structural role of phasins, some of them are involved in PHA biosynthesis. *Pseudomonas oleovorans* produces two major GAPs, the PhaF and PhaI phasins. The PhaF protein consists of two domains, the C-terminal domain that shows similarity with histone-like proteins, and the N-terminal domain, which shows 57% similarity with the complete PhaI protein (15.4 kDa), that mediates binding of the protein to the granule. The *pha* genes from *P. oleovorans* have been cloned and expressed in heterologous hosts, e.g. *E. coli*, leading to the production of bioplastics in such recombinant biocatalyzers. Moreover, the N-terminal domain of the PhaF protein is being successfully used for generating active fusion proteins that retain the ability to bind to the PHA granule. Since PHA granules are easy to purify by centrifugation, this experimental approach becomes an interesting strategy for large scale protein purification.

Biosafety

The release of recombinant organisms to the open field for removal of contaminants (bioremediation) raises serious public concerns. Two main concerns are how recombinant DNA can spread among indigenous bacterial populations (gene containment) and how the recombinant organism can be removed from the field once it has finished the programmed task (biological containment). An appropriate approach for increasing the predictability of recombinant microorganisms is to provide them with active containment systems based on complex regulatory circuits that control the expression of a lethal function, e.g., the RNase colicin E3 and the restriction endonuclease EcoRI. The combination of the two lethal functions within the same system

ducción industrial de bioplásticos, hacen que este sistema sea ideal para su desarrollo a gran escala.

Bioseguridad

La liberación de organismos manipulados genéticamente al medio ambiente para la eliminación de contaminantes ocasiona ciertos temores en la sociedad por los posibles riesgos de transferencia del DNA recombinante a la población indígena de organismos (contención genética) y por la posible diseminación de los organismos recombinantes a lugares donde no se desea su presencia o su permanencia en el lugar de interés cuando el tóxico ya ha sido eliminado (contención biológica). Por todo ello, estamos desarrollando sistemas de contención biológica y genética de bacterias recombinantes basados en complejos circuitos de regulación acoplados a la expresión de una función letal (RNasa colicina E3, endonucleasa de restricción *EcoRI*). La combinación de las dos funciones letales en el mismo sistema de contención mejora la eficacia del mismo al reducir la aparición de mutantes que se escapan al efecto tóxico de ambas actividades enzimáticas. El control de la expresión de los genes letales se ha diseñado utilizando promotores constitutivos y el correspondiente antídoto (proteína de inmunidad E3 y metilasa *EcoRI*) para contención genética, o promotores/reguladores que responden a la presencia/ausencia del compuesto que se pretende degradar para contención biológica. Estos sistemas de muerte celular programada artificialmente son también de gran utilidad para estudios de transferencia de DNA en ecosistemas microbianos complejos.

Otros proyectos en colaboración

Utilizando técnicas de Biología Molecular el grupo desarrolla distintos proyectos de colaboración tanto de investigación básica como aplicada con otros grupos del CIB, la Universidad y la empresa. Entre los primeros hay que destacar la colaboración con el grupo de Genética Bacteriana del CIB con el que se desarrollan desde hace muchos años estudios moleculares sobre factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*. Fundamentalmente se están estudiando las relaciones estructura-función de las autolisinas de neumococo y de otras proteínas que tienen capacidad de unión a colina

increases the efficiency of containment by reducing the appearance of survivors that escape to the toxic effect of both lethal functions. The lethal genes have been expressed constitutively in the presence of the cognate antidote (the immunity E3 protein and the *EcoRI* methylase) for gene containment. A promoter/regulator couple that responds to the presence/absence of the pollutant intended to be degraded is the control element of the lethal gene in a biological containment system. These systems of artificially programmed cellular death are also of great interest to study DNA transfer in complex microbial ecosystems.

Other collaborative projects

Using the techniques of Molecular Biology the group is developing different collaborative projects of basic and applied research with other groups of the CIB, Universities and industries. Thus, we are collaborating with the CIB group of Bacterial Genetics to study at the molecular level the virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. We are studying the structure-function relationships of the pneumococcal autolytic proteins and other choline-binding proteins (CBPs). A remarkable objective of this research is the development of expression vectors to generate fusion proteins with the CBPs that can be easily purified on a matrix containing choline or a choline analogue. We are also collaborating with M. Menéndez of the Rocasolano Institute (CSIC) on the structural aspects of CBPs. Moreover, we are also analyzing, from both structural and functional points of view, the genomes of different pneumococcal bacteriophages. Regarding to the most applied research projects, we are collaborating with A. Carrascosa of the Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) on the production of beta- and alfa-galactosidases from *Thermus* sp. In addition, we are collaborating with the group of M.P. Castellón and C. Acebal of the Complutense University of Madrid and the company Antibióticos S.A. on the overproduction of industrial enzymes, such as the bacterial beta-lactam acylases and the D-amino acid oxidases of yeast, used for the semisynthesis of beta-lactam antibiotics. Within the antibiotic research field, we are also collaborating with the company PharmaMar.

(*choline-binding proteins*, CBPs). Un aspecto interesante de este trabajo es la aplicación de las CBPs para el desarrollo de vectores de expresión de proteínas de fusión con las CBPs las cuales permiten una fácil purificación de la fusión por su capacidad de unirse a matrices que contengan colina o moléculas análogas. En el estudio de los aspectos estructurales de las CBPs también se colabora con el grupo de M. Menéndez del Instituto Rocasolano (CSIC). Por otro lado, dentro de los estudios sobre neumococo se están analizando los genomas de distintos bacteriófagos tanto desde el punto de vista estructural como funcional. Entre los proyectos más aplicados, se está colaborando con el grupo de A. Carrascosa del Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) en la producción de beta- y alfa-galactosidasas de *Thermus sp.* También se colabora con el grupo de M.P. Castellón y C. Acebal de la Universidad Complutense de Madrid y con la empresa Antibióticos S.A. en la hiperproducción de enzimas industriales como las beta-lactam-acilasas bacterianas y las D-aminoácido oxidasas de levaduras utilizadas para la obtención de antibióticos beta-lactámicos semisintéticos. Dentro del mismo campo de la producción de antibióticos, el grupo también ha trabajado para la empresa PharmaMar.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, 07B/0031/1997 (1997–1999)
- CAM, 07M/0050/1999 (2000–2000)
- CAM, Contrato Programa (2000–2004)
- CICYT, AMB97-0603-C02-02 (1997-2000)
- CICYT, PB96-0809 (1997–2000)
- CICYT, 2FD97-1326-C03-02 (2000-2001)
- CICYT, 2FD97-1842 (2000–2001)
- Fundación Ramón Areces, FRA-XICN-BT (2000-2003)
- PharmaMar (2000–2000)
- Repsol YPF (2000-2001)
- UE, BIO4-CT97-2313 (1997-2000)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Jorge Alonso Palacios.** Nuevos sistemas de producción de enzimas para su utilización en la biotransformación de antibióticos. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Director: J.L. García López.

Patentes/Patents

- Galán Sicilia, B., Díaz Fernández, E., Ferrández Barca, A., Prieto Jiménez, M.A., García-Ochoa Soria, F., García Calvo, E., and García López, J.L. (2000). Un procedimiento para desulfurar dibenzotiofeno utilizando como biocatalizador una cepa de *Pseudomonas putida* recombinante en la que se han introducido genes aislados de *Rhodococcus erythropolis* y *Escherichia coli*. Patente Española 200000661

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Alonso, J., Barredo, J.L., Armisen, P., Díez, B., Salto, F., Guisán, J.M., García, J.L., and Cortés, E. (1999). Engineering the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* to facilitate its overproduction in *Escherichia coli* and its downstream processing by tailor-made metal chelate supports. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 88-95.
- Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Cortés, E., Barredo, J.L., Salto, F., Díez, B., Rodes, L., García, J.L., and Guisán, J.M. (1999). A fully active glutarylacylase tagged with a poly-his tail: single step purification by selective adsorption on tailor-made metal chelate affinity supports. *J. Chromat. A.* 848, 61-70.
- García, B., Olivera, E.R., Miñambres, B., Fernández-Valverde, M., Cañedo, L.M., Prieto, M.A., García, J.L., Martínez, M., and Luengo, J.M. (1999). Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-CoA-catabolon. *J. Biol. Chem.* 274, 29228-29241.
- García, P., González, M.P., García, E., García, J.L., and López, R. (1999). Molecular and biological characterization of LytC, a pneumococcal autolytic lysozyme with an unusual modular organization. *Mol. Microbiol.* 33, 128-138.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R., and García, J.L. (1999). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* 31, 1275-1281.
- Hernández-Justiz, O., Terreni, M., Pagani, G., García, J.L., Guisán, J.M., and Fernández-Lafuente, R. (1999). Biodiversity in enzymatic synthesis: evaluation of different enzymes as catalysts of the synthesis of several beta-lactamic antibiotics. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 336-343.
- Jaenecke, S., and Díaz, E. (1999). Construction of plasmid vectors bearing a NotI-expression cassette based on the lac promoter. *Internatl. Microbiol.* 2, 29-31.
- Prieto, M.A., Buehler, B., Jung, K., Witholt, B., and Kessler, B. (1999). PhaF, a polyhydroxyalkanoate granule associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPoI involved in the regulatory expression system of pha genes. *J. Bacteriol.* 181, 858-868.
- Prieto, M.A., Kellerhals, M., Bozzato, G.B., Radnovic, D., Witholt, B., and Kessler, B. (1999). Engineering a stable recombinant bacteria for production of chiral medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3265-3271.
- Roa, A., and García, J.L. (1999). New insights on the regulation of the pac gene from *Escherichia coli* W ATCC 11105. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 7-14.
- Díaz, E., and Prieto, A. (2000). Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 467-475.
- Espinosa, J.F., Asensio, J.L., García, J.L., Laynez, J., Bruix, M., Wright, C., Siebert, H.C., Gabius, H.J., Cañada F.J., and Jiménez-Barbero, J. (2000). NMR investigations of protein-carbohydrate interactions. Binding studies and refined three-dimensional solution structure of the complex between the B domain of wheat germ agglutinin and N,N',N''-triacylchitotriose. *Eur. J. Biochem.* 267, 3965-3978.
- Ferrández, A., García, J.L., and Díaz, E. (2000). Transcriptional regulation of the divergent paa catabolic operons for phenylacetic acid degradation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 12214-12222.
- Galán, B., Díaz, E., and García, J.L. (2000). Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ. Microbiol.* 2, 687-694.
- Galán, B., Díaz, E., Prieto, M.A., and García, J.L. (2000). Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. *J. Bacteriol.* 182, 627-636.
- López, R., González, M.P., García, E., García, J.L., and García, P. (2000). Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res. Microbiol.* 151, 437-443.
- Torres, B., Jaenecke, S., Timmis, K.N., García, J.L., and Díaz, E. (2000). A gene containment strategy based on a restriction-modification system. *Environ. Microbiol.* 2, 555-563.
- Yarea, J., Saiz, J.L., López Zumel, C., Monterroso, B., Rodríguez Arrondo, J.L., Laynez, J., García, J.L., and Menéndez, M. (2000). Do sequence repeats play an equivalent role in the choline-binding module of pneumococcal LytA amidase. *J. Biol. Chem.* 275, 26842-26855.

Genética Molecular de *Aspergillus* Molecular Genetics of *Aspergillus*

MIGUEL ÁNGEL PEÑALVA SOTO

Jefe de Grupo / Group Leader

MARÍA TERESA SUÁREZ GONZÁLEZ

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

EDUARDO A. ESPESO FERNÁNDEZ (Desde VIII-1999)

Investigador Contratado / Research Associate

JOSÉ MANUEL MINGOT ASCENÇÃO

OLIVIER VINCENT (Hasta XI-2000)

FRANCISCO SÁNCHEZ SÁNCHEZ (Hasta IX-2000)

B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

José Álvaro Blanco (Desde I-1998)

ELIECER DÍEZ HERNÁNDEZ

José Manuel Rodríguez Rodríguez (Desde VII-1998)

B. Predoctorales / Graduate Students

ELENA REYO HERNÁNDEZ

Personal Técnico / Technician

Regulación de la expresión génica por el pH ambiental

Aspergillus nidulans es un microorganismo eucariota. Como otros microorganismos saprofitos, tiene una enorme versatilidad metabólica, que le permite utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de carbono y/o nitrógeno. Un aspecto de esta versatilidad metabólica es su capacidad de crecer en un amplio rango de valores de pH, entre pH 2,5 y 10. Las enzimas y metabolitos extracelulares, así como ciertas permeasas, están expuestas a las variaciones del pH ambiental. Existe un mecanismo regulador que asegura que la síntesis de proteínas y metabolitos extracelulares se ajuste al pH ambiental, de manera que, por ejemplo, se sintetice fosfatasa ácida sólo cuando el pH ambiental es ácido y no cuando es alcalino. Este mecanismo regulador está mediado por el factor de transcripción PacC, que se activa cuando el pH ambiental es alcalino mediante una ruta de transducción de señal integrada por los productos de los genes *palA*, *palB*, *palC*, *palE*, *palH* y *palI*.

La activación de PacC por la señal de pH ambiental alcalino ocurre por procesamiento proteolítico. El producto de tra-

pH regulation of gene expression

Aspergillus nidulans is a eukaryotic microorganism. In common with other saprophytic fungi, *A. nidulans* shows a large metabolic versatility, which enables the fungus to use a variety of compounds as sole carbon and/or nitrogen sources. A key aspect of this wide metabolic versatility is its ability to grow over a very wide pH range (between 2.5 and 10). Extracellular enzymes and metabolites and certain permeases are exposed to the pH of the environment. A regulatory mechanism denoted 'pH regulation of gene expression' tailors the synthesis of these proteins and metabolites to the needs imposed by ambient pH, enabling the synthesis, for example, of an extracellular acidic phosphatase only when the environmental pH is acidic and not when it is alkaline. pH regulation of gene expression is mediated by the PacC transcription factor, which is activated when ambient pH is alkaline by a signal transduction pathway which includes the products of the *palA*, *palB*, *palC*, *palE*, *palH* and *palI* genes.

PacC activation takes place by proteolytic processing. In response to ambient alkaline pH, the 674 residue translation pro-

ducción de PacC (674 residuos) se procesa a una forma transcripcionalmente activa que contiene los ~248-250 residuos N-terminales. El dominio de unión a DNA, que consta de tres dedos de zinc del tipo Cys₂His₂ se localiza en la forma procesada y reconoce la secuencia 5'-GCCARG-3'. PacC alterna entre una conformación cerrada, insensible a la proteasa procesativa, y una conformación abierta, sustrato de dicha proteasa, en respuesta al pH ambiental. La interacción entre dos regiones que solapan el punto de reconocimiento de la proteasa procesativa y los aprox. 150 residuos C-terminales de PacC responden de la conformación 'cerrada'. El producto primario de traducción en la conformación cerrada es exclusivamente citoplásmico. El procesamiento proteolítico de PacC se correlaciona con la localización nuclear de la proteína.

La caracterización molecular de los productos *pal* no ha aportado datos significativos sobre las bases mecanísticas de la transducción de la señal de pH ambiental. En estrecha colaboración con el grupo del Prof. H.N. Arst (Imperial College, London) estamos caracterizando la naturaleza de esta ruta 'huérfana' de transducción de señal. Además, estamos usando el modelo de PacC para analizar genética y molecularmente el tráfico núcleo-citoplásmico en *Aspergillus*. Finalmente, usamos PacC como modelo de proteína regulada mediante procesamiento proteolítico, con el objeto de intentar caracterizar las bioquímicas de la reacción de proteólisis, que puede tener implicaciones mecanísticas conservadas en la escala evolutiva desde hongos a mamíferos.

Finalmente, la familia de proteínas PacC (y sus homólogos RIM101 en levaduras) no sólo son un determinante clave de la síntesis de gran cantidad de enzimas extracelulares y metabolitos de interés comercial, sino que recientemente se ha demostrado que tienen un papel básico en la patogenicidad de *Candida albicans*. El trabajo concertado de nuestro laboratorio y el de Herb Arst en Londres es líder en el campo y ha convertido *Aspergillus* en el organismo de referencia para el estudio de la regulación por pH ambiental en eucariotas y de su papel en la capacidad de *Candida albicans* para colonizar ambientes diversos, que es un factor clave de su patogenicidad.

El moho *Aspergillus* como organismo modelo para el estudio de metabolopatías congénitas en humanos

Nuestra segunda línea de trabajo se basa en una propuesta original sobre la utilización de *A. nidulans* como modelo para

duct of the *A. nidulans* *pacC* gene is processed to a functional form containing the ~248-250 N-terminal residues. The PacC DNA binding domain (DBD), containing three Cys₂His₂ zinc fingers and binding to GCCARG promoter sites is located centrally within the processed form. The alkaline pH-sensitive step in the regulatory cascade appears to be the accessibility of the PacC primary translation product to the processing protease, suggesting that PacC alternates between protease-resistant and protease-sensitive conformations in response to ambient pH. Interactions between two regions overlapping the processing site and the ~150 C-terminal residues hold the protein in a protease-inaccessible conformation. In the absence of pH signal, the translation product is localised in the cytosol. The processed PacC form is localised in the nucleus.

The molecular characterisation of the *pal* gene products has not clarified the mechanistic bases of ambient pH signal transduction. In close collaboration with Prof. Herbert N. Arst's group (Imperial College, London), we are firstly characterising this 'orphan' signal transduction pathway. Secondly, we are using a PacC-based system to genetically analyse nucleo-cytoplasmic protein trafficking in *Aspergillus*. Thirdly, we are using PacC as a model of a transcription factor activated by proteolytic processing, with the long term goal of understanding the molecular bases of the processing reaction, which may have mechanistic implications of broad significance.

The PacC family of transcription factors (and their RIM101 homologues in yeasts) are a key determinant in the synthesis of a number of extracellular metabolites and enzymes of commercial interest. Moreover, it has been recently found that RIM101 has a key role in the pathogenicity of *Candida albicans*. The concerted work of the Madrid (ours) and London (H.N. Arst's) laboratories leads the field of pH regulation and has converted the *A. nidulans* PacC system in a reference to understand pH regulation in eukaryotes, including the role of pH regulation in the adaptability of *C. albicans* to different pH environments, which appears to be a key factor for its pathogenicity.

The mould *Aspergillus* as a model organism for studying human inborn errors of metabolism

Our second research interest is based on our original proposal of using *A. nidulans* to understand as yet uncharacterised human inborn errors of metabolism. This proposal has been developed in collaboration with S. Rodríguez de Córdoba, as an

enfermedades hereditarias humanas del metabolismo, que ha sido implementada en colaboración con Santiago Rodríguez de Córdoba como experto en Genética Molecular Humana. Esta propuesta se basa en la enorme versatilidad metabólica de *A. nidulans*, que es capaz de utilizar la mayoría de los aminoácidos como fuente de carbono a través de rutas metabólicas análogas a las que funcionan en hepatocitos humanos. El análisis *in silico* de las bases de datos del genoma humano usando sondas de *Aspergillus* ha permitido la identificación del gen humano de alcaptonuria, del gen humano de maleilacetoacetato isomerasa y, recientemente, del gen de una subunidad de la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa.

La caracterización del gen de alcaptonuria mediante la utilización del modelo fúngico fue objeto, por la importancia histórica y básica de la alcaptonuria en la genética humana, de un comentario editorial de *Nature Genetics*, de un artículo en *Trends in Genetics* y ha sido incorporado como ejemplo ilustrativo en el la nueva edición del texto clásico de Genética de Griffiths et al. Asimismo se ha incorporado a libros best-sellers de divulgación sobre Genoma Humano, como

Nuestro trabajo en colaboración con el Dr. David Timm, de la Universidad de Indiana, ha llevado a la caracterización estructural de la homogentisato dioxigenasa, el enzima deficiente en alcaptonuria, y a la caracterización a nivel estructural y bioquímico de mutaciones causativas y ha convertido la alcaptonuria en una de las enfermedades mejor conocidas a nivel genético y molecular.

El trabajo de caracterización del gen de la maleilacetoacetato isomerasa y la construcción de un modelo de deficiencia mediante interrupción del gen en el hongo ha llevado a proponer un compuesto diagnóstico para la identificación bioquímica de pacientes deficientes.

El trabajo en la metilcrotonilglicinuria (un error congénito del metabolismo de leucina), en colaboración con los grupos de Magdalena Ugarte y Santiago Rodríguez de Córdoba, ha llevado a la caracterización molecular de los dos genes implicados en la enfermedad y al despistaje de mutaciones en estos genes. La metilcrotonilglicinuria es posiblemente la acidemia orgánica más frecuentes en ciertas áreas geográficas, tal como ha revelado el análisis masivo de neonatos por MS/MS.

expert human molecular geneticist and it is based on the large metabolic versatility of this mould, which resembles to a significant extent that of human hepatocytes. The fungus is able to grow on most amino acid as sole carbon source using the same metabolic pathways working in human hepatocytes. In silico analysis of databases using fungal protein sequences as probes allowed the identification of human genes for alcaptonuria, for maleilacetoacetate isomerase or, more recently, of the gene for one of the subunits of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase.

The characterisation of the human alcaptonuria gene using the fungal model was the subject of an editorial comment (and a title in the cover page) in Nature Genetics, and an article in Trends in Genetics. It has been incorporated in the new edition of the classical Griffiths et al. Genetics textbook, and it is cited in best-sellers and general public science books such as Matt Ridley's 'Genome: the autobiography of a species in 23 chapters' or Robert Pollack's 'The missing moment: how the unconscious shapes modern science'.

Our work in collaboration with David Timm (Indiana State University) has led to the structural characterisation of homogentisate dioxigenase (the enzyme deficient in alcaptonuria) and to the structural and biochemical characterisation of causative mutations and has converted alcaptonuria in one of the best understood diseases at the molecular level.

Our characterisation of the maleilacetoacetate isomerase gene and the construction of a fungal knock out model for a deficiency of this enzyme has lead us to propose a diagnostic compound for the biochemical identification of patients affected by the deficiency.

Our work with 3-methylcrotonylglicinuria (an inborn error of leucine metabolism), in collaboration with Magdalena Ugarte's and S. Rodríguez de Córdoba's groups, has led to the molecular characterisation of the two genes involved in the disease and the genotyping of causative mutation in affected patients. MS/MS screening of newborns has revealed that 3-methylcrotonylglicinuria is the most frequent organic acidemia in certain geographic areas.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGXII-UE, BIO4-CT96-0535 (1996-1999)
- CICYT, BIO97-348 (1997-2000)
- CAM, 08.6/0015/1997 (1997-2001)
- CICYT, SAF97-1789-E (1999)
- DGXII-UE, (QLRT-00729-1999) (1999-2002)
- DGICYT, 2FD97-1292 (2000-2001)
- DGICYT, BIO2000-0920 (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **José Manuel Mingot Ascençao.** Procesamiento proteolítico y regulación de la localización subcelular del factor de transcripción PacC por el pH ambiental. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Director: M.A. Peñalva Soto.

Patentes/Patents

- Suárez, T., Herbert, N. Arst, Jr. H.N., Turner, G., and Peñalva, M.A. (1999) Mejora de la producción de penicilina mediante la utilización de cepas transgénicas merodiploides para un gen regulador. N° Solicitud Española 9902706

Publicaciones/Publications**Artículos en Revistas/Journal Articles**

- Mingot, J.-M., Tilburn, J., Díez, E., Bignell E., Orejas, M., Widdick, D.A., Sarkar, S., Brown, C.V., (1999). Caddick, M.X., Espeso, E.A., Arst, Jr. H.N., and Peñalva, M.A. Specificity determinants of proteolytic processing of the *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site and processing occurs in yeast provided pH signalling is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1390-1400.
- Mingot, J.M., Peñalva, M.A., and Fernández-Cañón, J.M. (1999). Disruption of *phacA*, and *Aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction. *J. Biol. Chem.* 274, 4545-14550.
- Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., Díez, E., Denison, S.H., Tilburn, J., Espeso, E.A., Peñalva, M.A., and Arst, H.N., Jr. (1999). Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterisation. *Mol. Microbiol.* 33, 994-1003.
- Espeso, E.A., Roncal, T., Díez E., Rainbow, L., Bignell, E., Álvaro, J., Suárez, T., Denison, S.H., Tilburn, J., Arst, Jr. H.N., and Peñalva, M.A. (2000). On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* 19, 719-728.
- Titus, G.P., Mueller, H.A., Burgner, J., Rodríguez de Córdoba, S., Peñalva, M.A., and Timm, D.E., (2000). Crystal structure of human homogentisate dioxygenase. *Nat. Struct. Biol.* 7, 542-546.
- Rodríguez, J.M., Timm, D.E., Titus, G.E., Beltrán-Valero de Bernabé, D., Criado, O., Mueller, H.A., Rodríguez de Córdoba, S., and Peñalva, M.A. (2000). Structural and functional analysis of mutations in alkaptonuria. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2341.-2350.

Iniciadores e Inhibidores de la Replicación del DNA en Microorganismos

DNA replication initiators and inhibitors in Micro-organisms

RAMÓN DÍAZ OREJAS

Jefe de Grupo / *Group Leader*

ELENA FERNÁNDEZ-TRESGUERRES

RAFAEL GIRALDO SUÁREZ

Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Marc Lemonnier

Investigador Contratado / *Research Associate*

TERESA DÍAZ LÓPEZ

BEATRIZ MAESTRO GARCÍA-DONAS

ROSARIO SABARIEGOS JAREÑO (Hasta VII-2000)

SANDRA SANTOS SIERRA

B. Predoctorales / *Graduate Students*

CONSUELO PARDO ABARRIO

ANA M^a. SERRANO LÓPEZ

Personal Técnico / *Technicians*



Palabras clave: Replicación del DNA, iniciadores (RepA/ORC), toxinas bacterianas inhibidoras de replicación (Kid), plásmidos, estructura y función de proteínas y DNA

Biología Molecular de iniciadores de la replicación del DNA

RepA (26 kDa) es la proteína iniciadora de la replicación del DNA del plásmido pPS10 (un replicón específico de *Pseudomonas* aislado por nuestro grupo). RepA actúa también como represor transcripcional de su propia síntesis. Estudiando las bases moleculares de ambas funciones, hemos identificado:

- En la secuencia de RepA, los motivos responsables de las interacciones proteína-proteína (cremallera de leucinas, LZ) y proteína-DNA (alfa hélice-giro beta- alfa hélice, HTH).
- Las secuencias de DNA reconocidas por RepA: cuatro repeticiones directas de 22 pb (iterones) en el origen de replicación y una repetición inversa de 8 pb (operador) en el promotor de repA.
- Dos formas distintas de RepA, con funciones contra-

Keywords: DNA replication, initiators (RepA/ORC), bacterial toxins that inhibit DNA replication (Kid), bacterial plasmids, structure -function of proteins and DNA

Molecular Biology of DNA replication initiators in microorganisms

RepA (26 kDa) is the DNA replication initiator protein of the plasmid pPS10 (a replicon specific of *Pseudomonas* isolated by our group). RepA also acts as a transcriptional repressor of its own synthesis. As a result of our studies on the molecular basis of both functions, we have found:

- In RepA protein sequence, motifs responsible for protein-protein (Leucine-Zipper, LZ) and protein-DNA (Helix-Turn-Helix, HTH) interactions.
- DNA sequences recognised by RepA: four directed repeats of 22 bp (iterons) in the origin of replication and an inverted repeat of 8 bp (operator) in repA gene promoter.
- Two different species of RepA protein, with distinct functions: DNA replication initiation (monomers) and transcriptio-

puestas: iniciación (monómeros) y represión (dímeros).

- Dos dominios globulares en RepA (del tipo "winged-helix") que adoptan conformaciones alternativas: compacta (en los dímeros) y elongada (en los monómeros). El primer dominio, que incluye el LZ, contiene un motivo adicional de interacción con el DNA, que permanece críptico en la conformación compacta, mientras que colabora con el HTH (situado en el segundo dominio) en el reconocimiento de los iterones por la conformación elongada de RepA.

- Mutaciones, afectando tanto al motivo LZ como al primer dominio globular de RepA, amplían el rango de huésped de pPS10 a Enterobacterias. Por otra parte un mutante afectado en la proteína iniciadora de la replicación del DNA en *E. coli* (DnaA) permite el establecimiento del plásmido pPS10 en esta bacteria. Estas mutaciones, junto con las descritas en RepA, indican la existencia de interfases de interacción entre proteínas replicativas de plásmido y huésped. (B. Maestro, 2001, Tesis Doctoral).

- Los iniciadores de la replicación eucarióticos Orc4 y Cdc6 presentan en sus extremos C-terminales dominios "winged-helix" similares al de RepA, así como otras similitudes que incluyen su estado de asociación y su interacción con chaperonas de la familia Hsp70. Estos resultados sugieren la presencia de un mismo módulo estructural y funcional en la proteína de replicación del ancestro hipotético de todas las formas de vida celulares [Giraldo, R. & Díaz-Orejás, R. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4938-4943].

Biología Molecular de inhibidores de la replicación del DNA

Esta línea se centra en un sistema bacteriano de muerte condicional, *parD* (*kis*, *Kid*), que fue encontrado en nuestro laboratorio en el factor de resistencia a antibióticos de enterobacterias R1. El sistema *parD* es un operón que codifica para dos pequeñas proteínas, una toxina, *Kid* (por determinante de "killing", 12 kDa) y una anti-toxina, *Kis* (por supresor de *Kid*, 10 kDa). *Kid* es capaz de inhibir inicio de replicación del DNA dependiente de la principal helicasa replicativa (*DnaB*).

Durante el periodo cubierto por esta memoria se han identificado regiones en *DnaB* implicadas en la interacción funcional con *Kid*, así como zonas en ésta implicadas en toxicidad. Análisis de mutantes no tóxicos de *Kid* en sistemas de

nal repression (dimers).

- Two globular "winged-helix" domains in RepA that adopt alternative conformations: compact (in the dimers) and elongated (in the monomers). The first domain, that includes a LZ motif, contains an additional DNA binding-motif which remains hidden in the compact conformation, but co-operates with the HTH motif (found in the second domain) in binding to the iterons by the RepA elongated conformation.

- Mutations affecting both the LZ motif and the first globular domain in RepA broaden the host-range of pPS10 to Enterobacteria. On the other hand a mutant in the replication initiator protein of *E. coli* (*DnaA*) allows the establishment of the pPS10 plasmid in that host. These mutations, as well as those described in RepA, point to the existence of interfases for interaction between replicative proteins from plasmid and host bacterium. (B. Maestro, 2001, Doctoral Thesis).

- The eukaryotic DNA replication initiators Orc4 and Cdc6 have at their C-termini a "winged-helix" domain, similar to that found in RepA. Similarities also extend to their association state and to their association with chaperones of the Hsp70 family. These findings suggest that a common functional and structural protein module was present in the DNA replication initiator of the ancestor of all present cellular forms [Giraldo, R. & Díaz-Orejás, R. (2001) Proc. Natl. Acad. USA 98: 4938-4943].

Molecular Biology of DNA replication inhibitors

This research line is focused in a bacterial conditional killer system, *parD* (*kis*, *Kid*), that we discovered in the antibiotic resistance factor R1. The *parD* operon codes for two proteins: an antitoxin, *Kis* (killer suppressor, 10 kDa), and a toxin, *Kid* (killing determinant, 12 kDa). *Kid* is able to inhibit *DnaB*-dependent DNA replication at the initiation stage.

During the period covered by this memory, regions of *DnaB* involved in interactions with *Kid*, as well as regions of *Kid* involved in interaction with *DnaB*, have been identified. Functionally active mutants of *DnaB* with increased sensibility to *Kid* have been isolated. Biochemical analysis of *Kid* protein mutants by means of in vitro replication assays, indicated that the toxic activity of *Kid* correlates with its ability to inhibit DNA replication. Biochemical data support the hypothesis that *Kid* toxin acts inhibiting the loading of *DnaB* to form a functional replisome complex.

replicación *in vitro* indican que la actividad tóxica de Kid y su capacidad de inhibir replicación son correlativas. Se han aislado mutantes de DnaB que conservan la funcionalidad de esta helicasa y que confieren mayor sensibilidad a Kid. Resultados bioquímicos indican que Kid actúa bloqueando la carga de DnaB en el replisoma.

Se ha obtenido recientemente la estructura de la toxina Kid a 1.4 Amstrongs de resolución mediante métodos cristalográficos (colaboración con el grupo del Prof. D. Rice, Universidad de Sheffield). La información genética proporcionada por mutantes de la proteína Kid ha permitido identificar en esta estructura las regiones implicadas en la toxicidad y en interacción con la antitoxina Kid.

Asímismo se dispone de información avanzada sobre las estructuras de la toxina Kid y de la antitoxina Kis mediante espectometría de RNM (colaboración con el Prof. R. Boelens de la Universidad de Utrechnt).

Se ha encontrado, en colaboración con el grupo de R. Laskey (Universidad de Cambridge, UK) que Kid y Kis son activas en células eucariotas y que Kid es capaz de promover apoptosis en líneas tumorales humanas. (de la Cueva, Tesis Doctoral).

Detailed information on the structure of the Kid protein has been obtained by X-ray crystallography by our collaborators D. Rice and J. Rafferty (Sheffield University, UK). Resolution of the structure of the Kid and the Kis by NMR methods is well advanced (R. Boelens, Utrecht University, The Netherlands).

The interaction between Kis and Kid neutralizes the toxicity of Kid and results in a complex that represses the parD operon. These properties have been used to obtain genetic information on the regions in Kis and Kid required to form the regulatory complex, and to define regions in Kis required to neutralize Kid. In collaboration with the Sheffield and Utrecht crews, the first crystallization trials of the Kis-Kid complex have been attempted and the structural characterization of interfaces of interaction of Kis and Kid are being approached by NMR.

We have found, in collaboration with the group of R. Laskey (Cambridge, UK) that Kis and Kid are also active in eukaryotic cells and that Kid is able to promote apoptosis in human tumor cell lines. (de la Cueva, Doctoral Thesis).

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MEC-CICYT, PB96-0917 (1996-1999)
- EC, BIO4-CT98-0106 (1998-2000)
- MEC-CICYT, BIO99-0859-C03 (1999-2002)
- CA, CP 2000-2003 (2000-2003)
- EC, QLK2-CT-2000-00634 (2000-2003)
- MEC-CICYT, PM99-0096 (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Guillermo de la Cueva.** Inhibición de proliferación celular en eucariotas y activación de apoptosis en células humanas mediante el control transcripcional independiente de los genes procariontes *kis* y *kid*: análisis del mecanismo de acción e implicaciones en terapia. Universidad Complutense de Madrid, 2000. Director: R. Díaz Orejas

Patentes/Patent

- De la Cueva Méndez, G., Laskey, R.A., Mills, A.D. y Díaz-Orejas, R. (1999). Methods and means employing bacterial toxin for killing eukaryotic cells. GB 9916810.6

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Díaz Orejas, R. y Espinosa Padrón, M. (1999). Elementos extracromosómicos: así comienzan a replicarse. *Investigación y Ciencia* 273, 34-35.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Espinosa, M., Cohen, S., Couturier, M., del Solar, G., Díaz-Orejas, R., Giraldo, R., Jänniere, L., Miller, C., Osborn, M. y Thomas, C.M. (2000). Plasmid replication and copy number control. En: *The horizontal gene pool: bacterial plasmids and gene spread* (C.M. Thomas edit.). Harwood Academic Publishers pg. 1-47.
- Gerdes, K., Ayora, S., Canosa, I., Ceglowski, P., Díaz-Orejas, R., Franch, T., Gultayaev, A.P., Bugge Jensen, R., Kobayashi, J., MacPherson, C., Summers, D., Thomas, C.M. y U. Zielenkiewicz U. (2000). Plasmid maintenance systems En *The horizontal gene pool: bacterial plasmids and gene spread* (C.M. Thomas edit.). Harwood Academic Publishers pg. 49-85.

Biología Molecular de Hongos Basidiomicetos

Molecular Biology of Basidiomycete Fungi

ALDO E. GONZÁLEZ BECERRA

Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

OCTAVIO LOERA (HASTA III-2000)

Investigador Visitante / *Visiting Scientist*

AINHOA ARANA CUENCA

ALEJANDRO TÉLLEZ JURADO

M^a CARMEN TERRÓN

B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

MILTON ALVARADO SEPÚLVEDA (HASTA VII-2000)

JOSÉ M^a CARBAJO GARCÍA

TANIA GONZÁLEZ DÍAZ DE VILLEGAS

HOWARD JUNCA DÍAZ (HASTA VII-2000)

RICARDO SILVA SOTO

SUSANA YAGÜE PLAZA

ERNESTO ZAPICO FERNÁNDEZ

B. Predoctorales / *Graduate Students*



Palabras clave: Basidiomicetos, transcripción de genes, expresión heteróloga, control de la expresión, degradación de aromáticos

Optimización de las condiciones para la degradación de compuestos aromáticos presentes en diferentes sustratos

Los hongos basidiomicetos en general y los basidiomicetos de podredumbre blanca en particular han demostrado su capacidad para degradar o transformar varios materiales tales como: sustratos de tipo fenil propano que se encuentran acumulados en la fracción lignina en la naturaleza formando parte de la estructura de la madera y en las plantas en general, en una fracción de los combustibles fósiles (aproximadamente un 11%) y en los derivados de estas materias primas como resultado de los procesos tecnológicos desarrollados por la raza humana. En general forman parte de la más abundante fracción de compuestos aromáticos sobre el planeta y se corresponde con un 40% de la energía solar almacenada en las plantas, además de los hidrocarburos fósiles. A partir de estos procesos naturales que inciden en las actividades productivas

Keywords: Basidiomycete, gene transcription, heterologous expression, control of expression, aromatics degradation

Optimization of the conditions to degrade aromatic compounds present in different substrates

Basidiomycetous fungi, in general, and white-rot basidiomycetes in particular have demonstrated their capacity of degrading or transforming several materials such as: phenyl-propane substrates which are present in the lignin fraction of wood and plants; in a fraction of fossil fuels and in the derivatives of these raw materials as a result of the technological processes developed by the human being. In general, these substrates are a part of the most abundant fraction of aromatic compounds in the planet and correspond with a 40% of the solar energy stored in the plants, besides the fossil hydrocarbons. Taking as starting point these natural processes, that affect the productive activities and that have given continuity and consistency to the work in this laboratory, there are several research lines that have been followed and that are described below. Firstly, it has been investigated the capacity of some selected fungal species to grow on and decolori-

y que han dado continuidad y consistencia al trabajo de este laboratorio se han planteado las líneas de investigación que se describen. En primer lugar se ha investigado la capacidad de algunas especies seleccionadas de hongos para crecer y decolorar, algunos de los compuestos antes mencionados presentes en efluentes industriales o en materias primas utilizadas para la obtención de productos manufacturados. Esta fase de experimentación se ha hecho utilizando cinéticas monitorizadas con cultivos en fase líquida y sólida, a la que se ha aplicado una posterior evaluación de algunos indicadores mediante análisis espectrofotométricos. En esta línea se ha colaborado con los laboratorios de la Dra. E. Arias, Dpto., de Microbiología, Fac. Ciencias, U. Alcalá, Dr. Juan Carlos Villar del INIA, Madrid, Dra. Mar Villamiel, IFI, CSIC, Madrid y Drs. Carmen Martín y M^a José Blanco, IER, CIEMAT, la Dra Esperanza Valdés, ICIDCA, La Habana, Cuba.

Regulación de la transcripción de lacasas y peroxidasas frente a diferentes inductores. Expresión heteróloga de las lacasas

Una segunda línea se ha centrado en las capacidades de cuatro especies de hongos basidiomicetos que han demostrado su habilidad para decolorar/degradar los sustratos antes mencionados estudiando sus complejos enzimáticos, normalmente constituidos por familias de enzimas y las familias de genes que codifican para las mismas. La detección, clonación y secuenciación de los genes responsables de las actividades lacasa y manganeso peroxidasa han sido priorizadas para los estudios de expresión frente a compuestos modelo de tipo aromático, o a aquellos que se ha detectado su presencia en los efluentes industriales o en las materias primas. La pregunta fundamental ¿cuál o cuáles son los mecanismos de degradación de los compuestos aromáticos por hongos?, aún no encuentra una respuesta definitiva. Y ha sido una de las razones por las que estos estudios se han orientado a los mecanismos de expresión de los genes, incidiendo en los potenciales factores que actúan sobre los mismos para que se disparen. Se ha estudiado su regulación por fuentes de carbono y nitrógeno, por ser los parámetros que más inciden en el metabolismo de los hongos en general, y además se ha investigado la presencia de compuestos de tipo aromático porque pueden actuar como inductores, y la concentración de Cobre

ze some of the compounds mentioned before that are present in several industrial waste-waters or in raw materials used to obtain manufactured products. This experimental stage has been performed using monitored kinetics using cultures in liquid and solid phases, to which a further spectrophotometrical analysis of several parameters has been applied. In this line we have collaborated with the laboratories of Dr. E. Arias, Dpto., de Microbiología, Fac. Ciencias, U. Alcalá, Dr. Juan Carlos Villar from INIA, Madrid, Dr. Mar Villamiel, IFI, CSIC, Madrid, Drs. Carmen Martín and M^a José Blanco, IER, CIEMAT, and Dr Esperanza Valdés, ICIDCA, Havana, Cuba.

Regulation of laccases and peroxidases transcription by different inductors. Heterologous expression of laccases

A second research line have been focused on the capacities of four basidiomycetous fungal species that have demonstrated their ability to decolorize/degrade the substrates mentioned before, by studying their enzymatic complex, usually constituted by enzymes families and gene families that codify for them. The studies of detection, cloning and sequencing of genes responsible of laccase and manganese-peroxidase activities have been prioritized for the expression studies in the presence of aromatic-model compounds, or compounds detected in the industrial waste-waters or in the raw materials. The main question is: which is or are the mechanisms that fungi use to degrade aromatic compounds?, a definitive answer has not been still found. This has been one of the reasons for the orientation of these studies toward the expression mechanisms of genes, paying attention to the potential parameters that switch them on. It has been studied their regulation by the carbon and nitrogen source due to they are the most important parameters affecting in fungal metabolism in general. Moreover it has also been investigated the presence of aromatic compounds because they can act as inductors, and finally the concentration of copper and manganese due to their possible action on both proteins. The results have demonstrated that all these factors are implicated, in a different way, in the regulation of lac and mnp genes. In addition it has been demonstrated using multiple RT-PCR studies, that both, aromatic-model compounds and the complete effluents have a clear incidence in the regulation of a laccase gene-family. Moreover, this regulation is differential for every gene in particular and besides acts over all of them as a whole modulating their "switch-on", which give rise to

y Manganeso por la posible acción de estos metales sobre ambas proteínas. Los resultados han demostrado que todos estos factores están implicados en la regulación de los genes *lac* y *mnp*, de diferente manera y se ha demostrado mediante estudios de RT-PCR múltiple, que tanto los compuestos modelo de tipo aromático como los efluentes en su conjunto tienen una clara incidencia en la regulación de una familia de genes de lacasa y que esta regulación además de ser diferencial para cada gen en particular actúa sobre todos ellos en su conjunto modulando su disparo, lo que produce un efecto de compensación sobre la actividad enzimática que normalmente se mide mediante técnicas espectrofotométricas. Una vez producidos los ADNc de los genes de lacasa se intentó su transformación heteróloga en huéspedes como, diferentes especies de levaduras e hifomicetos, obteniéndose clones positivos que expresaban la proteína recombinante a nivel de cultivos sólidos. Finalmente, teniendo en cuenta los resultados alcanzados en el proyecto OXEPI donde participó nuestro laboratorio se llevaron a cabo estudios para la búsqueda de inductores naturales de las lacasas, obteniéndose valiosa información acerca del comportamiento de los genes frente a compuestos presentes en los vegetales valorando la presencia de transcritos en las correspondientes cinéticas. En este trabajo hemos colaborado con el grupo del Dr. Alan Dobson, Microbiology Dpto. U. Cork, Irlanda, el Dr. Angel Domínguez, Instituto de Biología Molecular y Genética, CSIC, U. Salamanca, la Dra. María Fernández-Lobato, Fac. Ciencias. U. Autónoma, Madrid

Búsqueda de nuevas actividades enzimáticas en especies de hongos que crecen en condiciones extremas

Una tercera línea se orientó a la búsqueda de actividad de enzimas extracelulares oxidantes en hongos que crecen en ambientes extremófilos a altas temperaturas y pH ácido, en una amplia colección de más de mil cepas aisladas de Río Tinto y una doscientas de la zona tropical de México en Mérida, Yucatán, se han puesto a punto cinéticas para determinar actividad lacasa y manganeso peroxidasa a pH ácido y 50 °C de temperatura. La posible ventaja en este caso es que la búsqueda no se ha circunscrito sólo a los basidiomicetos sino que el barrido se ha ampliado a los hifomicetos, teniendo en cuenta que algunas de estas cepas se podrían aplicar a

a compensation effect of the enzymatic activity that usually is measured spectrophotometrically. Once obtained the ADNc of laccase genes their heterologous expression was tried using as a host different species of yeast and Hiphomycetes, giving rise to positive clones that expressed the recombinant protein in solid cultures. Finally, taking in account the results raised in the OXEPI Project, where our laboratory participated, several studies for screening natural laccase-inductors, giving raise to valuable information regarding the behaviour of the genes towards compounds present in vegetal, by monitoring the presence of transcripts in the corresponding kinetics. In this work we have collaborated with the team of Dr. Alan Dobson, Microbiology Department. U. Cork, Irlanda, Dr. Angel Domínguez, Instituto de Biología Molecular y Genética, CSIC, U. Salamanca, and Dr. María Fernández-Lobato, Fac. Ciencias. U. Autónoma, Madrid.

Search of new enzymatic activities in fungal species that grow in extreme conditions

A third research-line was oriented to look for extracellular oxidative enzymes in fungi growing in extreme environments such as high temperatures and acid pH. The screening was done over a wide collection of more than one thousand strains isolated from Tinto River and two hundred strains from tropical zone of México in Mérida, Yucatán. Some methods to determine laccase and manganese peroxidase activities at acid pH and 50 °C, were set up. The possible advantage in this case is that the search was not only done over basidiomycetes but also over hiphomycetes, taking in account that some of these strains could be applied to the decontamination of soils with petroleum. One of the Mexican laboratories has signed a deal with "Petróleos Mexicanos" (PEMEX) in order to start these studies. A second advantage of these studies is that these species, in the case they demonstrate oxidative enzymatic activity, offer great advantages for the transformation studies, aim that is more difficult to attain with basidiomycetous fungi. Eleven species of organisms acidophilus and five thermophilus have demonstrated good activity levels of extracellular enzymes and the studies of molecular biology have been already started. In this line we collaborated with the following groups: Dr. Ricardo Amils, Fac. Ciencias U. Autónoma, Madrid, Dr. Gustavo Viniegra, Dpto. Biotecnología, U. Autónoma Metropolitana, México D.F., Dr. Sara Solís, Dpto

la descontaminación de suelos ocasionados por crudo de petróleo ya que uno de los laboratorios mexicanos ha suscrito un convenio con Petróleos Mexicanos (PEMEX) para poner en marcha estos estudios. Una segunda ventaja de estos estudios es que estas especies en caso de demostrar actividad enzimática para algunas enzimas oxidantes ofrecen grandes ventajas para los estudios de transformación, objetivo que es más difícil de alcanzar con los hongos basidiomicetos. Once especies de acidófilos y cinco de termófilos han demostrado buenos niveles de actividad y se han comenzado los estudios a nivel de biología molecular. En esta línea colaboramos con los siguientes grupos: Dr. Ricardo Amils, Fac. Ciencias U. Autónoma, Madrid, Dr. Gustavo Viniegra, Dpto. Biotecnología, U. Autónoma Metropolitana, México D.F., Dra. Sara Solís, del Dpto de Biotecnología, U. de Mérida, Dr. Carlos Regalado, U. Querétaro, México.

Finalmente en esta línea se circunscriben algunos estudios relacionados con la conservación del patrimonio artístico, evaluando la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos sobre diferentes materiales y el impacto de los mismos sobre el sustrato como sobre los posibles fenómenos de lixiviación en el post-tratamiento por el biocida, en esta actividad hemos colaborado con la Dra. Nieves Valentín, Ministerio de Cultura y Educación y el Dr. Fernando Dorrego, Instituto E. Torroja, CSIC, Madrid.

de Biotecnología, U. de Mérida, and Dr. Carlos Regalado, U. Querétaro, México.

Finally in this line some studies related with the conservation of artistic heritage are included, evaluating the capacity of inhibiting the growth of several microorganisms on different materials and the impact of organisms over the substrate as well as the possible phenomena of lixiviation in the post-treatment with the biocide. In this activity we have collaborated with Dr. Nieves Valentín, Ministerio de Cultura y Educación and Dr. Fernando Dorrego, Instituto E. Torroja, CSIC, Madrid.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- UE, FAIR-CT95-0805 (DGXII-SSMA) (1996-1999)
- CAM, 07M/0730/97 (1997-1999)
- CICYT, BIO97-0655 (1997-2000)
- UE, ENV4-CT98-0711 (1998-1999)
- DG XII RTD-96-8021 (1998-2001).
- UE, DGXII RTD-96-8021 (1998-2001)
- CONACYT/México, 29298-B (1999-2001)
- CONACYT/México, (2000-2002)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- **Ernesto Zapico Fernández** Estudios fisiológicos y moleculares de la expresión de lacasa en *Coriolorpisis gallica* y su aplicación a la decoloración de efluentes industriales. Universidad de Alcalá, 1999. Director: Aldo González.

Publications/Publications

- Yagüe, S., Terrón, M.C., González, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G.C., and González, A.E. (2000). Biotreatment of tannin-rich beer- factory wastewater with white-rot basidiomycete *Coriolorpisis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14, 905-910.
- González, T., Terrón, M.C., Yagüe, S., Zapico, E., Galletti, G.C., and González, A.E. (2000). Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry monitoring of fungal-biotreated distillery wastewater using *Trametes* sp. I-62 (CECT 20197) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14, 1417-1424.

Premios y Distinciones *Awards and Honours*

— **José Antonio Abrisqueta Zarrabe**

Premio "Pamplona" de la Sociedad de Genética Humana en reconocimiento a su trayectoria humana y profesional dentro del campo de la Genética Humana en España, 1999.

Miembro del Consejo Editorial de la Revista "Puericultura Hoy", órgano de Expresión de la Sociedad Española de Puericultura, 1999.

Miembro de la Comisión de Redacción de la Revista de la Sociedad Internacional de Bioética "*Journal of the International Society of Bioethics*", 1999.

Co-fundador y profesor de la Cátedra de Genética y Vida Humana de la Universidad de Monterey (México), 2000.

— **Ángela Casado Moragón y M^a Encarnación López-Fernández**

Premio SEMES-Madrid 2000, Distinción: Mejor Comunicación al VII Congreso 2000.

— **Pedro Castañera Domínguez**

Redactor asociado de la revista: Phytoma. Agropubli, S.L., 1999.

Presidente del grupo de trabajo del Área Científico-Tecnológica del Programa: Recursos y Tecnologías Agroalimentarias del Plan Nacional de I+D (2000-2003), 1999.

Miembro de la Comisión del Área de Ciencias Agrarias del CSIC, 1999.

Miembro de la Mesa Tecnológica: Necesidades de I+D de las Empresas Españolas en el Área Científico-Tecnológica de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias, 1999.

Vocal representante del MEC en la Comisión Nacional de Evaluación de Productos Fitosanitarios, 1999.

— **Ramón Díaz Orejas**

Miembro del Comité Editorial de *FEMS Microbiological Reviews*, 2000.

— **José Ramón Díaz-Ruiz**

Miembro del Consejo Editorial de la Revista "Virología", publicación oficial de la SEV, 1999 y 2000.

Miembro del Consejo de Redacción de la Revista "Phytoma-España", 1999 y 2000.

Miembro del Consejo de Redacción de la Revista "Investigación Agraria. Serie Producción y Protección Vegetales", publicación del INIA, 1999 y 2000.

— **Manuel Espinosa**

Evaluador invitado para el *Danish Research Council*, 1999.

Miembro del Comité de Coordinación de la Acción Concertada EU-BIOTECH-MECBAD, 1999.

Premio de la Real Academia de las Ciencias, 2000.

Evaluador invitado para el *International Centre For Genetic Engineering and Biotechnology*, 2000.

Miembro del *International Advisory Board of the Meeting Plasmid Biology*, 2000.

— **Concepción García Mendoza**

Académica Correspondiente de la Real Academia de Farmacia, 1999.

Evaluadora de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina), 1999.

— **Pedro García González**

Miembro de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Microbiología, 1999.
Miembro de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Virología, 1999.

— **Ernesto García López**

Miembro del Comité editorial de la revista *Microbial Drug Resistance*, 2000.

— **Gonzalo Giménez Martín**

Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Madrid, 1999.

— **Aldo González Becerra**

Espuela de Plata, a la cooperación internacional, Consulado de Chile, 1999.

— **Rubens López García**

Miembro del Comité Editorial de *FEMS Microbiol Letters*, 2000.
Miembro del Comité Editorial de la Revista *Microbial Drug Resistance*, 2000.

— **Francisco Javier Medina Díaz**

Tesorero de la *European Cell Biology Organisation (ECBO)*, 2000.

— **Eduardo Páez Abril**

Miembro del Consejo Editorial de la revista *Virología* (publicación oficial de la SEV), 1999-2000

— **Gema Pérez Farinós**

Premio Extraordinario de Doctorado. Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. Curso: 1999-2000.
Director: Pedro Castañera Domínguez.

— **Ismael Ignacio Sánchez Ramos**

Premio Extraordinario de Doctorado. Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. Curso: 1999-2000.
Director: Pedro Castañera Domínguez.

Organización de Congresos y Cursos *Organization of Congresses and Courses*

- **M^a Enriqueta Arias, María Jesús Martínez, Angel T. Martínez**
Curso Doctorado: "Aplicaciones Tecnológicas de la Degradación de la Lignocelulosa". Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Junio, 2000.

- **Pedro Castañera Domínguez y Félix Ortego Alonso**
Curso Doctorado: Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 2000.

- **Flora de Pablo**
Fundación Juan March. Workshop on "*Control of signalling by protein phosphorylation*". Madrid, 2000.

- **Enrique J. de la Rosa**
3^a Reunión de la ApoRed (Red Española de Apoptosis). Salobreña, Granada, 1999.

- **Jesús del Mazo y Omar Triana**
Curso: "Regulación de la Expresión Génica en la Diferenciación y el Desarrollo de Eucariontes. Aplicaciones Biotecnológicas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Colombia, Octubre, 2000.

- **José Ramón Díaz-Ruiz, Isabel García Luque, Dionisio López Abella, M^a Teresa Serra Yoldi, Francisco Tenllado**
Curso Doctorado: "Virus Patógenos de Plantas". Centro de Investigaciones Biológicas/Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Marzo, 1999 y Marzo, 2000.

- **Manuel Espinosa**
Curso de Doctorado: "Replicación, Reparación y Expresión Génica en Bacterias". Universidad Complutense de Madrid, Mayo, 1999.
Curso de Doctorado: "Replicación, Reparación y Expresión Génica en Bacterias". Universidad Complutense de Madrid, Mayo, 2000.
César de Haro y Manuel Espinosa. Congreso Nacional de la SEBBM (Workshop). Pamplona, Septiembre, 1999.

- **Ernesto García López**
Miembro del Comité Organizador "*Third European Congress of Chemotherapy*" de la Sociedad Española de Quimioterapia. Madrid, Junio, 2000.

- **Santiago Lamas Pláez**
Organizador. VI Simposio Internacional Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo. A Coruña, Noviembre, 1999.

- **Vicente Larraga**
Presidente del Comité Organizador. Congreso: *Ist Spanish-British Meeting on Molecular Parasitology*. Toledo, Abril, 2000.

— **Dionisio López-Abella**

Curso Doctorado: "Transmisión de virus de plantas por insectos vectores". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Febrero, 1999.

— **Angel T. Martínez**

Miembro del Comité Científico de la "27th EUCEPA Conference". Grenoble, Francia, Octubre, 1999.

Miembro del Comité Científico del "6th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp". Burdeos, Francia, Septiembre, 2000.

— **Susana Moreno Díaz de la Espina**

XVIIth International Workshop on the Cell Nucleus. Sesión: Nucleoskeleton/Nuclear Matrix. Praga, República Checa, Junio, 1999.

— **Eduardo Páez Abril**

Miembro del Comité Científico del VI Congreso Nacional de Virología. Majadahonda, Madrid, 1999.

— **Luis I. Rivas**

Workshop on Eukaryotic antibiotic peptide. Fundación Juan March, Febrero, 1999.

— **Covadonga Vázquez, María Jesús Martínez, Angel T. Martínez**

Curso Doctorado: "Hongos filamentosos: Aplicaciones Biotecnológicas y Ambientales". Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid, Enero, 1999.

Curso Doctorado: "Hongos filamentosos: Aplicaciones Biotecnológicas y Ambientales". Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid, Enero, 2000.

Aula de Seminarios

Seminars

Coordinador: Luis I. Rivas
Secretaría: M^a Victoria Lafita

1999

Dr. Brian Oliver
NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, USA
Sex determination in the germline of Drosophila

Dr. Mariano Barbacid
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, "Carlos III", Madrid
Análisis genético del ciclo celular in vivo

Dr. Heiner Westphal
National Institute of Child Health and Human Development, NIH, Bethesda Maryland USA
Genes that fashion the brain

Dr. Kim Nasmyth
Research Institute of Molecular Pathology, Vienna Biocentrum, Austria
Separating sister chromatids

Prof. Boris Margulis
Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Rusia
The possible molecular basis of Hsp70's (Heat-shock protein 70) protective function

Prof. James E. Haber
Rosenstiel Center and Department of Biology, Brandeis University, Waltham, USA
Checkpoint responses and repair of chromosome breaks in yeast

Dr. Ronald D.G. McKay
National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA
Building the brain with stem cells

Dr. Sergio Mendoza
Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brasil
Immunogenicity of a first generation vaccine against American tegumentary leishmaniasis: the Brazilian experience

Dr. Dorian Lamba

Elettra Synchrotron Light Source, Protein Crystallography, CNR, Trieste, Italia
The fibrinolytic cascade: Structure and function of plasminogen activations

Prof. Ignacio Rodríguez Crespo

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, Madrid
Relaciones estructura-función en las oxido nítrico sintasas

Dr. Juan Carlos Alonso

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid
Emsamblaje nucleoproteico con la subsecuente activación de la DNA helicasa replicativa G40P en el origen de replicación del bacteriófago SPPI de Bacillus subtilis

Dr. Walter G. Zumft

Universidad de Karlsruhe, Alemania
Bacterial metabolism of nitric oxide

Dr. Peter Schuck

Bioengineering and Physical Science Program, ORS, National Institutes of Health, Bethesda, USA
Characterisation of biomolecular interactions by equilibrium titration in surface plasmon resonance biosensors

Dr. Dusan Turk

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Josef Stefan Institute, Slovenia
New insights into the immune system response based on the crystal structure of P41 invariant chain fragment bound to cathepsin L.

Dr. José M. Valpuesta

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid
Estudios estructurales y funcionales por criomicroscopía electrónica de la chaperonina citoplasmática CCT

Prof. Robert Schleif

Johns Hopkins University, USA
The light-switch mechanism of AraC action

Dr. Eduardo Rial

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid
Regulación de la UPC2

Dr. Joaquim Roca Bosch

Departamento de Biología Molecular, CID, CSIC, Barcelona
Una nueva propiedad del DNA superenrollado: Efecto de la quiralidad superhelicoidal en la actividad topoisomerasa tipo-2

Dr. Peter Klatt

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid

Regulación de la unión al ADN del factor de transcripción cJun por estrés oxidativo y nitrosativo

Dr. Victor Muñoz van den Eynde

National Institutes of Health, Washington, USA

Estudio del plegamiento de proteínas con un abordaje multidisciplinar

Prof. Ricardo N. Farías

Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Tucuman, Argentina

J25 un nuevo antibiótico cíclico

Dr. Michiel van Lookeren Campagne

CPRO-DL, Wageningen, Holanda

Unraveling the mechanism that control plant reproductive development

Dr. Gareth Griffiths

EMBL, Heidelberg, Alemania

The life cycle of vaccinia virus

Dra. Françoise Puvion-Dutilleul

CNRS, Villejuif, Paris, Francia

Structure-function relationships in the nucleus. Application to DNA virus-infected cells (herpes simplex virus type 1 and adenovirus)

Prof. Mauro Durante

Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Università degli Studi di Pisa, Pisa, Italia

Interactions of heavy metal ions with in vitro cultured plant cells: biochemical and molecular aspects

Prof. Pavel Hozak

Institute of Experimental Medicine, Praga, República Checa

The dynamics of the cell nucleus

Dr. Graham Head

Monsanto Co., St. Louis, MO, USA

Insect resistance management for transgenic insect-protected crops

Dr. Sebastián Cerdán

Instituto de Investigaciones Biomédica, CSIC, Madrid

Nuevas aplicaciones de la resonancia magnética en biomedicina

Dra. Carmen Ayuso García

Departamento de Citogenética Humana, Clínica Ntra. Sra. de la Concepción, Madrid

Aplicaciones actuales de la biotecnología al consejo genético

Prof. José Fernández Piqueras

Facultad de Biología, Universidad Autónoma, Madrid

Genes supresores de linfomas en un modelo animal

Prof. José M^a Segovia de Arana

Presidente del Consejo Asesor de Sanidad, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid

Investigación Biomédica

Prof. Sofía Ramos

Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Asturias

Modulación de la actividad transcripcional del receptor de estrógenos por la melatonina en células de carcinoma de mama humano

Prof. Hans Deckmyn

Laboratory for Thrombosis Research, IRC, Leuven Campus, Kortrijk, Bélgica

Molecular mechanisms of platelet adhesion to collagen

Dr. Miguel Pocovi

Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza

Bases genéticas de las hipoalfalipoproteinemias

Dr. José A. López

Hematology/Oncology (111 H), Houston, USA

The glycoprotein Ib-IX-V complex: a pivotal adhesion receptor mediating platelet interactions with vascular matrix, endothelium, and leukocytes

Dra. Montserrat Baiget

Institut de Recerca del Hospital, Hospital de la Santa Creu I Sant Pau, Barcelona

Inestabilidad mitótica y meiótica del gen de la Distrofia Miotónica

Dr. Alfonso Valencia

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

La predicción de la interacción entre proteínas en el contexto de la información genómica

Dr. Victor de Lorenzo

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

Secreción de anticuerpos por Escherichia coli: bacterias contra virus en el intestino animal

Prof. Jacek Wierchos

Microscopía Electrónica, Universidad de Lleida, Lleida

El meteorito marciano ALH84001: ¿Existen huellas inorgánicas de vida extraterrestre?

Dr. Ralf Eisenbrandt

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlín, Alemania

The sex-pili of RP4 and the Ti-plasmid are composed of cyclic subunits

Prof. Julio Montoya

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza

Regulación de la síntesis de RNA mitocondrial de mamíferos

Dr. José Luis Fernández Luna

Hospital Universidad Marqués de Valdecilla, Santander

Regulación de la apoptosis en progenitores hematopoyéticos

Dr. Pablo García de Frutos

Department of Clinical Chemistry, Lund University, University Hospital, Malmö, Sweden

Biología de GAS6 (growth arrest specific gene 6): un guardián del endotelio vascular

Dra. Chamorro Somoza

DNAX, California, USA

Consecuencias de la eliminación del factor de transcripción PU.1 en macrófagos de ratón

Dra. Cristina López-Rodríguez

Center of Blood Research, Harvard Medical School, USA

NFAT5: The NFAT family of transcription factors expands through different directions

2000

Dr. Fernando Peláez

Director de CIBE-NPDD. Merck, Sharp & Dohme de España, Madrid

El descubrimiento de nuevos fármacos a partir de productos naturales: de los antibióticos al mimético de insulina

Dr. José Luis Jorcano

CIEMAT, Madrid

Control de la proliferación y diferenciación en epidermis: Desde modelos transgénicos a la terapia génica

Prof. Nicholas R. Cozzarelli

PNAS Editor-in-Chief, Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, USA

Mechanisms of DNA Unlinking and Chromosome Segregation

Dra. Marja Jäättelä

Apoptosis Laboratory, Institute of Cancer Biology, Danish Cancer Society, Denmark

Control of tumour cell apoptosis by heat shock protein 70

Dr. Dimitris Kioussis

Head of Molecular Immunology, National Institute for Medical Research, London, UK
Locus Control Regions, chromatin structure and position effect variegation

Prof. Felipe Cortés

Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla
Topoisomerasas de DNA: mecanismo de acción y posible papel en la reparación

Dr. Peter Cook

The Sir William Dunn School of Pathology, South Parks Road, Oxford, UK.
Transcription factories and the path of transcripts to the cytoplasm

Dr. Stephane Blanc

Station de Recherches de Pathologie Comparée. INRA-CNRS. Saint Christol les Aies. FRANCIA
Study of various viral products and their interactions involved in aphid-transmission of cauliflower mosaic virus

Dr. Juan José López-Moya

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid
Biotecnología en la lucha contra el virus de la sharka

Prof. Vladimir Vorobyev

Instituto de Citología de la Academia Rusa de Ciencias. San Petesburgo, Rusia.
Structure of transcribing chromatin: POU-domain octamer binding transcription factor Oct3/4. Differential expression and transcriptional coactivators

Prof. Carlos Gutiérrez Merino

Departamento de Bioquímica, Universidad de Extremadura, Badajoz
Modulación de la actividad de la Ca-ATPasa del retículo sarcoplasmático del músculo esquelético y sus implicaciones para la homeostasis del calcio citosólico

Dr. Juan Saus

Instituto de Investigaciones Citológicas, Valencia
Hacia un modelo molecular de la enfermedad autoinmune

Dr. Alan Nurden

Lab. Pathologie Cellulaire de l'Hémostase UMR 5533 CNRS, Hôpital Cardiologique, Pessac, France
Recent advances in our understanding of the molecular basis of inherited platelet disorders

Dr. Enrique Méndez

Unidad de Analisis Estructural de Proteinas, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid
Analisis de proteínas y péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF, la técnica del siglo 21

Prof. Donald J. Winzor

Centre for Protein Structure, Function and Engineering, Univ. Queensland, Brisbane, Australia

The potential of biosensor technology for characterizing biomolecular interactions by quantitative affinity chromatography

Dr. Karl Brand

University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

Control of thymocyte proliferation via redox-regulated expression of glycolytic genes

Prof. M.A. Cevallos

Universidad Autónoma de México, México

Replicación del plásmido Rhizobium

Prof. Paolo Bernardi

Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Padova, Italy

Mitochondria and cell death: The (w)hole story

Prof. José López Barneo

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla

Mecanismos celulares de la sensibilidad al oxígeno

Dr. Juan Ramón Rodríguez

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid.

Desarrollo de nuevas estrategias de inmunización contra malaria

Dr. François Cornet

Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France

Chromosome dimer resolution in E. coli: control of a recombination machine

Prof. Roberto Kolter

Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA

Desarrollo de biofilms bacterianos y la evolución de la patogénesis

Dra. Lucia Banci

Centro di Risonanze Magnetiche. Sesto Fiorentino, ITALIA

Structure and dynamics of metalloproteins in solution

Prof. Jorge E. Galán

School of Medicine, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, USA

Striking a balance: modulation of the host-cell actin cytoskeleton by Salmonella

Dr. Grzes Wegrzyn

Universidad de Gdansk, Polonia

Regulation of λ DNA replication: Inheritance of the replication complex

Dra. Betty Felenbok

Institut de Genetique et Microbiologie, Centre d'Orsay UPS, FRANCE

Carbon catabolic pathways in Aspergillus nidulans: the ethanol utilization system, an example of interplay between regulatory circuits

Dra. Elisa Martí

Instituto de Neurobiología "Ramón y Cajal", CSIC, Madrid

Diferenciación de motoneuronas espinales: Interacción entre sonic hedgehog y matriz extracelular

Dra. Michelle Letarte

Division of Immunology & Cancer Research, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, CANADA

Learning more about the role of endoglin in vascular development and integrity through a murine model of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia

Dr. Alan Ashworth

The Breakthrough Toby Robins Breast Cancer Research Centre. Institute of Cancer Research, Mary-Jean Mitchell Green Building, Chester Beatty Laboratories, London, UK.

The breast cancer susceptibility Gene BRCA2

Dr. Thomas Maciag

Director, Center for Molecular Medicine, Maine Medical Center Research Institute, South Portland, USA

Molecular Mechanisms of Angiogenesis

Dr. José Aramburu

Center for Blood Research. Harvard Medical School. USA.

Control de la actividad transcripcional de NFAT mediante fosforilación/defosforilación

Dirección



Dirección

Director: JUAN M. RAMÍREZ DE VEGER LOBO

Vicedirectores: M^a ELENA FERNÁNDEZ-TRESGUERRES
RODRIGUEZ-VIGIL
PABLO HERNÁNDEZ VALENZUELA
ANGEL TOMÁS MARTÍNEZ FERRER

Secretaría: ANA CHAO VÁZQUEZ

Gerencia

Gerente: GERMÁN LERMA RODRIGO
LUIS GARCÍA TRUJILLO

Administración

Administrador: ANGEL ABRIL NOVELLA

JULIA ANADES BESNARD
CONCEPCIÓN CHORRO DE VILLACEBALLOS
ESTRELLA GÓNZÁLEZ HERRADURA
NIEVES GÓNZÁLEZ ESTEBAN
MARÍA SOLEDAD REIG FERNÁNDEZ

Personal: MANUEL MOLINA MORENTE

Compras y Almacén

Jefe de Compras y Almacén: RAMÓN SERRANO CORONADO
ELISA BALLESTEROS VILLAMAYOR
MARGARITA FERNÁNDEZ GARCÍA
JOSÉ MANUEL PÉREZ CABRIA
M^a TERESA RAMOS JIMÉNEZ
FRANCISCO SERRANO CORONADO



Servicios Generales

Conserjería

JAVIER DE LA FLOR HERNÁNDEZ
DIEGO GARCÍA HERRANZ
LUCÍA GONZÁLEZ DÍAZ
CELIA LÓPEZ ADSUARA
JUAN MANUEL MARTÍN SIERRA

Limpieza de Material y Lavandería

BLASA CARRIÓN FERNÁNDEZ
SARA FUENTES ROMERO
AMPARO GARCÍA MORENO
FELICIDAD LARA MARTINEZ
CARMEN LÓPEZ CASTELLANOS
MARÍA LÓPEZ RAMÍREZ
MARÍA LÓPEZ ROMERA
FRANCISCA MORANTE GONZÁLEZ
SOLEDAD PASTOR ENCABO
ROSA M^a MARGARITA PAZ CHAO

Comedor

BEATRIZ FRAILE FERNÁNDEZ
ANGELA MUÑOZ ALONSO
DOLORES PORTERO LAULA
ENCARNACIÓN SÁNCHEZ RUIZ
FELINA SOMOLINOS GARCÍA

Franqueo

JOSE MANUEL GORDILLO RODRIGUEZ

Vigilancia

LORENZO MONTERO VERA
DOMINGO MURIEL MUÑOZ
ANTONIO MORENO CALLE

Reprografía

M^a JESÚS GARABITO SECO



Servicio Técnico

Jefe Serv. Técnico:

ANTONIO MANUEL J. GARCÍA ALVAREZ

LORENZO ALONSO MACARRÓN
ANGEL ARRANZ BOMBÍN
JOSÉ CABAÑAS OLIVARES
ANGEL GUERRERO RIVERO
M^a JOSÉ HERNÁNDEZ PARADELO
JOSÉ M^a MELGUIZO SOLIER
MARCOS JAVIER MORAL GARCÍA
ANGEL PACHECO DEL OLMO
ANTONIO PÉREZ PARDO
JUAN MIGUEL TIJERO PÁRAMO
FRANCISCO TIRADO AMARILLA
MANUEL RAMÓN TORO MONSALVE
ANTONIO VALLEJO DOMÍNGUEZ
PALOMA VELASCO DE LA ROCA

Delineación

AURELIO HURTADO CARO

Fotografía

MÓNICA M^a FONTELA LAGO
VICTORIA MUÑOZ MARTÍN

Informática

JOSÉ MANUEL ANGULO ZAPATERO
JOSÉ RAMÓN DIEZ BUENO

Aplicaciones Informáticas

Responsables Científicos: DR. ANTONIO ROMERO
DR. FCO. JAVIER MEDINA

MARIO GARCÍA LACOBÁ



Servicios Especiales

Microscopía electrónica

Responsable Científico: DRA. CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA

M^a DOLORES GUIRAO REY

Animalario

Responsable Científico: DR. JOSÉ M^a ROJO HERNÁNDEZ

DIEGO DIAZ IZQUIERDO
GABINO GARCÍA AMAYA
FRANCISCO JOSÉ GARCÍA GONZÁLEZ
MANUEL MORENO CALLE
SUSANA SERNA MARTÍNEZ

Cromatografía

Responsable Científico: DR. JUAN ANTONIO LEAL OJEADA

ALICIA PRIETO ORZANCO

Cultivo de Células Animales

Responsable Científico: DR. AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ

BLANCA PÉREZ MACEDA
ALEJANDRA MARTÍN RUIZ

Química de Proteínas

Responsable Científico: PROF. GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO

JOSÉ JAVIER VARELA ESPINOSA
EMILIA APORTA SOSA

Citometría de Flujo

Responsable Científico: DR. JOAQUÍN TEIXIDO CALVO

PEDRO LASTRES VARO

Esterilización

Responsable Científico: DR. M. AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ

ROSA DÍAZ LÓPEZ

Microscopía Confocal

Responsable Científico: DRA. M^a DEL CARMEN RISUENO ALMEIDA

M^a ANGELES OLLACARIZQUETA DONAZAR

Ultracentrifugación Analítica

Responsable Científico: DR. GERMÁN RIVAS CABALLERO

CARLOS ALFONSO BOTELLO

Secuenciación Automática de DNA

Responsables Científicos: DR. SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ

SONIA CARBAJO GARCÍA

ASUNCIÓN DÍAZ CARRASCO

M^a GRACIA PORRAS FRANCO

Espectroscopía

Responsable Científico: DR. JUAN MANUEL RAMÍREZ DE VERGER

Protección Radiológica

Responsable Científico: DRA. M^a LUISA BOTELLA CUBELLS

MARIA CEBRIÁN ECHARRI

M^a DEL CARMEN DOÑORO VAZQUEZ

Biblioteca

Responsable Científico: DR. PABLO HERNÁNDEZ

EVENCIO CABRERIZO DE LAS HERAS

CONSOLACIÓN GORDILLO SALAMANCA

M^a ANGELES SACRISTÁN MARTÍN

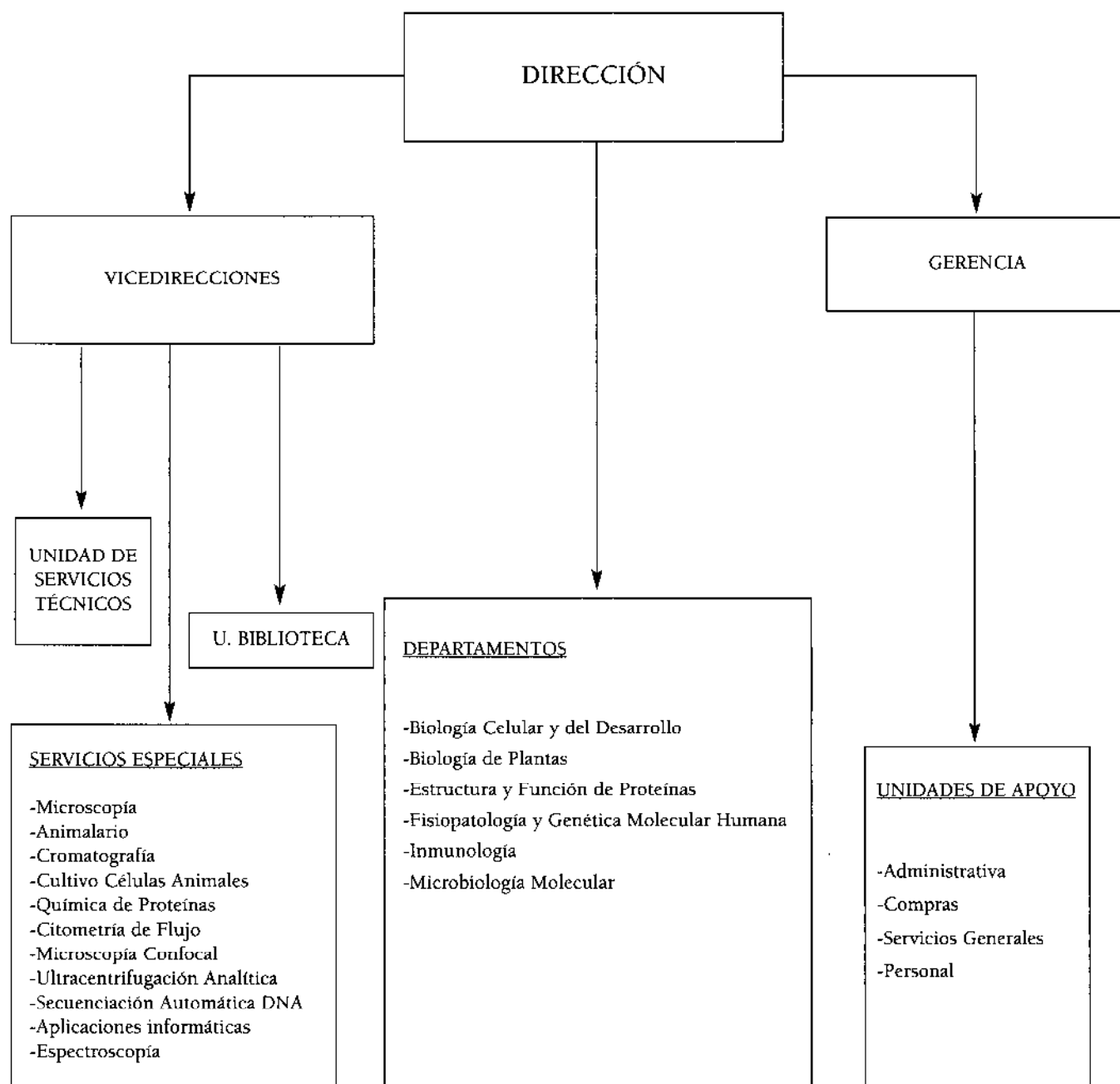
M^a TERESA SILLÓ MARTÍNEZ

JOSÉ MIGUEL SOTO ESTEBANEZ

M^a JESÚS VILELA MANRIQUE

ANA M^a FERNÁNDEZ RIVERA

ORGANIGRAMA CIB



Altas, Excedencias y Jubilaciones de Personal

ALTAS

GIRALDO SUÁREZ, RAFAEL
GONZÁLEZ MANCHÓN, CONSUELO
GRANADINO GIOENECHEA, BEGOÑA
LOPEZ-MOYA GÓMEZ, JUAN JOSÉ
LOZANO PUERTO, M^a ROSA
PÉREZ-SALA GOZALO, M^a DOLORES
VERNOS RUCASSIER, ISABEL

EXCENDENCIAS

GÓMEZ ALARCÓN, GONZALO (15/9/1999)
LORENZO VIÁN, JUANA M^a (01/09/2000)

JUBILACIONES

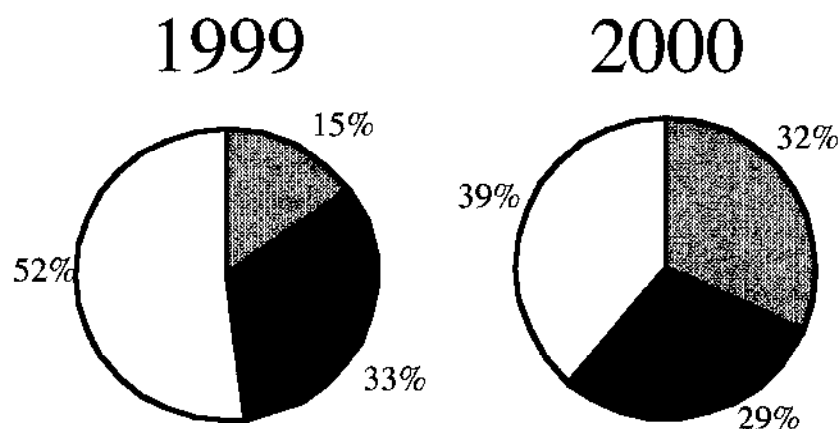
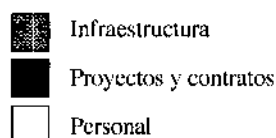
BLANCO MARCOS, ELOY (31/08/00)
FERNÁNDEZ DE RIVERA Y RUIZ DEL CASTILLO, ANA M^a (30/06/00)
JAREÑO CAÑADA, M^a ASUNCIÓN (19/08/00)
MORENO JIMÉNEZ, BÁRBARA (27/06/99)
ROBLES CHILLIDA, MANUEL ROBLES (14/10/99)
TORROJA CAVANILLAS, EDUARDO (25/12/99)

RESUMEN DE LOS DATOS ECONÓMICOS

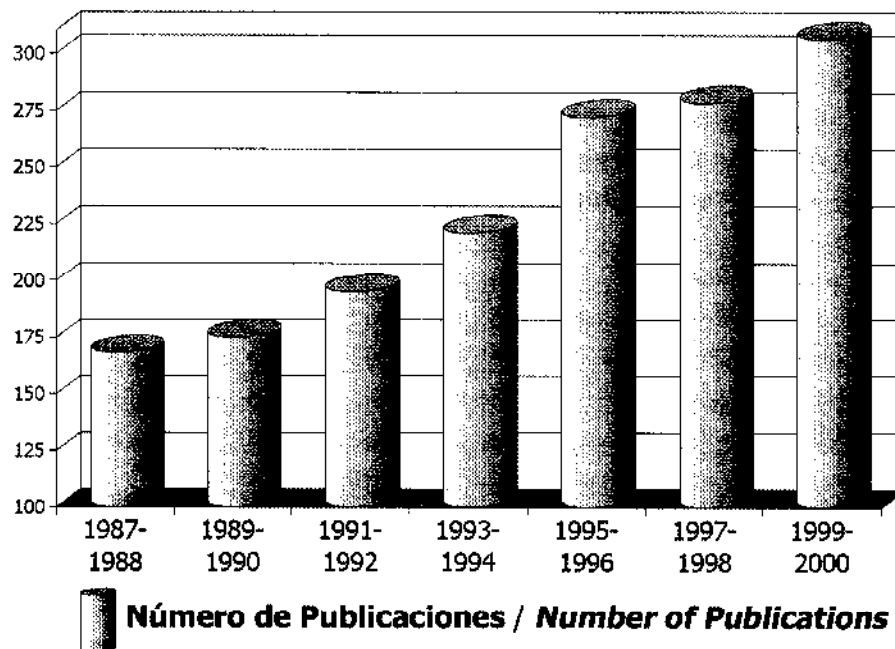
PRESUPUESTO DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Concepto	1999	2000
Presupuesto ordinario	131.766	138.725
Inversiones	58.581	684.687
Apoyo a la infraestructura	106.040	106.690
Varios	22.622	18.839
TOTAL DE INFRAESTRUCTURA DEL CENTRO	319.009	948.941
Proyectos P. Nacional, P.G.C., F.I.S. y C.A.M.	423.845	600.807
Investigación Contratada	98.799	91.427
Proyectos de la Unión Europea	156.658	146.798
Asistencia Técnica	9.369	17.152
TOTAL PROYECTOS, CONTRATOS Y ASISTENCIA TÉCNICA	688.671	856.184
PERSONAL	1.098.986	1.124.977
TOTAL	2.106.666	2.930.102

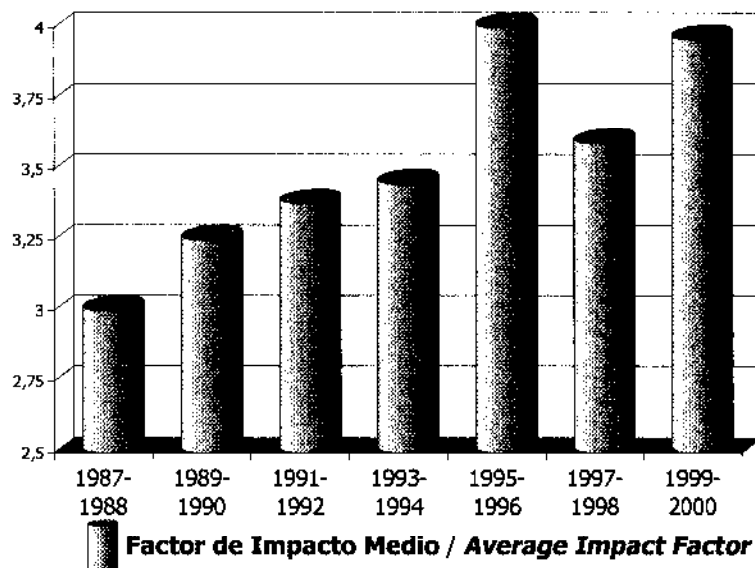
En miles de pesetas



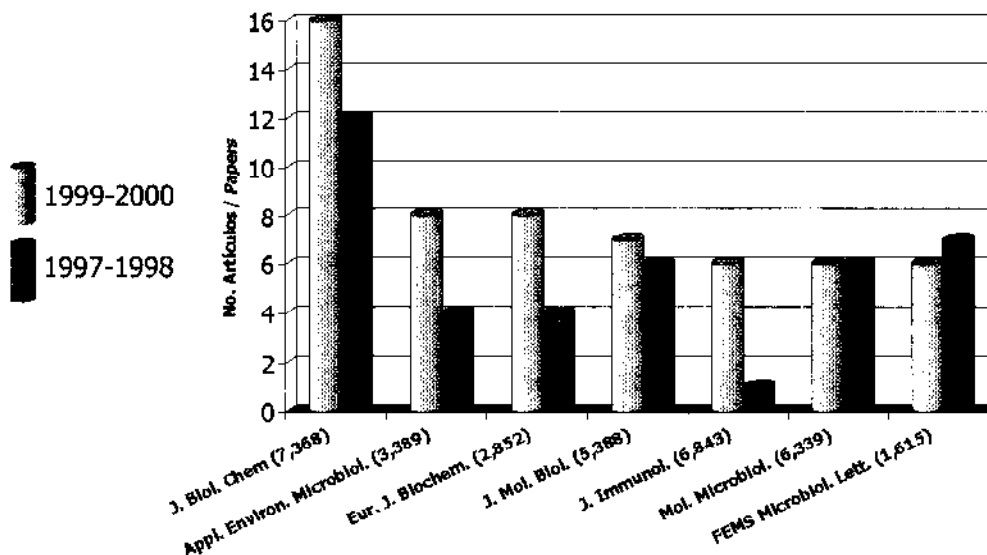
EVOLUCIÓN DEL NÚMERO DE PUBLICACIONES Y SU IMPACTO



Evolución del Factor de Impacto medio de las revistas utilizadas



Revistas con más Artículos procedentes del CIB Journals with more Papers from CIB



Índice de Investigadores en Plantilla

NOMBRE	CATEGORÍA	DEPARTAMENTO	E-MAIL	Tlf. -EXT.	PÁGINA
- ABRISQUETA ZARRABE, José Antonio	Invest. Cient.	Dptº Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	abrisqueta@cib.csic.es	91 562 0307	117
- ALLER TRESGUERRES, Patricio	Cient Titular	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	aller@cib.csic.es	4247	11
- ANDREU MORALES, José M.	Prof. Invest.	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	j.m.andreu@cib.csic.es	4381	93
- APARICIO ALONSO, Pedro J.	Prof. Invest.	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	pjaparicio@cib.csic.es	4363	107
- BARASOAIN BLASCO, Isabel	Cient.Titular	Dptº Inmunología	i.barasoain@cib.csic.es	4216	154
- BERNABÉU QUIRANTE, Carmelo	Invest. Cient.	Dptº Inmunología	bernabeu.c@cib.csic.es	4246	142
- BOTELLA CUBELLS, Luisa Mª	Cient Titular	Dptº Inmunología	cibluisa@cib.csic.es	4312	142
- CASADO MORAGÓN, Angela	Cient.Titular	Dptº Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	acasado@cib.csic.es	4219	119
- CASTAÑERA DOMÍNGUEZ, Pedro	Prof. Invest.	Dptº Biología de Plantas	castan@cib.csic.es	4264	69
- CORBÍ LÓPEZ, Angel L.	Invest. Cient.	Dptº Inmunología	acorbi@cib.csic.es	4312	142
- De PABLO DÁVILA, Flora	Invest. Cient.	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	fdepablo@cib.csic.es	4360	39
- Del MAZO MARTÍNEZ, Jesús	Cient.Titular	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	jdelmazo@cib.csic.es	4324	31
- Del SOLAR DONGIL, Gloria	Cient.Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	gdelsolar@cib.csic.es	4210	103
- De la HERA MARTÍNEZ, Antonio N.	Invest. Cient.	Dptº Inmunología	adelahera@cib.csic.es	4394	157
- De la ROSA CANO, Enrique J.	Cient.Titular	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	ejdelarosa@cib.csic.es	4274	39
- De la TORRE GARCÍA-QUINTANA, Consuelo	Prof. Invest.	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	delatorrec@cib.csic.es	4307	8
- DÍAZ FERNÁNDEZ, Eduardo	Cient.Titular	Dptº Microbiología Molecular	ediaz@cib.csic.es	4426	193
- DÍAZ OREJAS, Ramón	Invest. Cient.	Dptº Microbiología Molecular	ramondiaz@cib.csic.es	4351	204
- DÍAZ PERIRA, J. Fernando	Cient Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	fer@cib.csic.es	4380	93
- DÍAZ RUIZ, José Ramón	Prof. Invest.	Dptº Biología de Plantas	jrduazruiz@cib.csic.es	4406	64
- DÍEZ CORIÉS, José Luis	Invest. Cient.	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	jldiez@cib.csic.es	4311	25
- ESPINOSA PADRÓN, Manuel	Prof. Invest.	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	mespinosa@cib.csic.es	4209	103
- ESPONDA FERNÁNDEZ, Pedro H.	Invest. Cient.	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	esponda@cib.csic.es	4336	36
- FERNÁNDEZ GÓMEZ, Mª Encarnación	Invest. Cient.	Dptº Biología de Plantas	mefernandez@cib.csic.es	4259	46
- FERNÁNDEZ-TRESGUERRES, Mª Elena	Cient.Titular	Dptº Microbiología Molecular	etresguerres@cib.csic.es	4353	204
- GARCÍA GONZÁLEZ, Pedro A.	Cient.Titular	Dptº Microbiología Molecular	pgarcia@cib.csic.es	4428	188
- GARCÍA HERMIDA, Ofelia	Cient.Titular	Dptº Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	ofeliagh@cib.csic.es	4355	122
- GARCÍA LÓPEZ, Ernesto A.	Prof. Invest.	Dptº Microbiología Molecular	e.garcia@cib.csic.es	4428	188
- GARCÍA LÓPEZ, José Luis	Invest. Cient.	Dptº Microbiología Molecular	jlgarcia@cib.csic.es	4418	193
- GARCÍA LUQUE, Isabel	Cient.Titular	Dptº Biología de Plantas	igarcia@cib.csic.es	4410	61
- GARCÍA MENDOZA, Concepción	Invest. Cient.	Dptº Microbiología Molecular	cgm@cib.csic.es	4262	178
- GARCÍA PARDO, Mª de los Angeles	Invest. Cient.	Dptº Inmunología	agarciapardo@cib.csic.es	4430	134
- GIMÉNEZ GALLEGU, Guillermo	Prof. Invest.	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	gimenez_gallego@cib.csic.es	4378	82
- GIRALDO SUÁREZ, Rafael	Cient Titular	Dptº Microbiología Molecular	rgiraldo@cib.csic.es	4269	204

Índice de Investigadores Actuales en Plantilla

NOMBRE	CATEGORÍA	DEPARTAMENTO	E-MAIL	TEL. -EXT.	PÁGINA
- GODAY BAYLINA, Clara	Cient.Titular	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	godaylab@cib.csic.es	4314	22
- GONZÁLEZ BECERRA, Aldo E.	Cient.Titular	Dptº Microbiología Molecular	aldo@cib.csic.es	4414	208
- GONZÁLEZ MANCHÓN, Consuelo	Cient.Titular	Dptº Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	cgmanchon@cib.csic.es	4441	122
- GRANADINO GOENECHEA, Begoña	Cient.Titular	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	begogran@cib.csic.es	4213	18
- HERNÁNDEZ CRESPO, Pedro	Cient.Titular	Dptº Biología de Plantas	pedro@cib.csic.es	4275	69
- HERNÁNDEZ VALENZUELA, Pablo	Cient.Titular	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	p.hernandez@cib.csic.es	4232	2
- KRIMER SMUNIS, Dora B.	Cient.Titular	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	dbkrimer@cib.csic.es	4238	2
- LAMAS PELÁEZ, Santiago	Cient.Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	slamas@cib.csic.es	4302	74
- LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA, Vicente	E.Prof. Invest.	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	vlarraga@cib.csic.es	4207	99
- LEAL OJEDA, J. Antonio	Invest. Cient.	Dptº Microbiología Molecular	aleal@cib.csic.es	4437	185
- LÓPEZ-MOYA GÓMEZ, Juan José	Cient.Titular	Dptº Microbiología Molecular	jjlopez@cib.csic.es	4403	64
- LÓPEZ ABELLA, Dionisio	Prof. Invest.	Dptº Biología de Plantas	dlabela@cib.csic.es	4404	64
- LÓPEZ GARCÍA, Paloma	Invest. Cient.	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	plg@cib.csic.es	4203	85
- LÓPEZ GARCÍA, Rubens	Prof. Invest.	Dptº Microbiología Molecular	ruben@cib.csic.es	4428	188
- LOZANO PUERTO, Mª Rosa	Cient.Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	rlozano@cib.csic.es	4367	82
- MARTÍN GONZÁLEZ, Antonio	Invest. Cient.	Dptº Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.		4436	116
- MARTÍN REQUERO, Mª Angeles	Cient.Titular	Dptº Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	amrequero@cib.csic.es	4224	122
- MARTÍNEZ FERRER, Angel T.	Invest. Cient.	Dptº Microbiología Molecular	atmartinez@cib.csic.es	4407	170
- MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, Mª Jesús	Cient.Titular	Dptº Microbiología Molecular	mjmartinez@cib.csic.es	4439	170
- MEDINA DÍAZ, Fco. Javier	Cient.Titular	Dptº Biología de Plantas	fjmedina@cib.csic.es	4261	51
- MORENO DÍAZ DE LA ESPINA, Susana	Cient.Titular	Dptº Biología de Plantas	smoreno@cib.csic.es	4257	46
- ORTEGO ALONSO, Félix	Cient.Titular	Dptº Biología de Plantas	ortego@cib.csic.es	4266	69
- PÁEZ ABRIL, Eduardo	Cient.Titular	Dptº Inmunología	epaez@cib.csic.es	4387	165
- PARRILLA SÁNCHEZ, Roberto L.	Prof. Invest.	Dptº Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	rparrilla@cib.csic.es	4204	122
- PEÑALVA SOTO, Miguel A.	Invest. Cient.	Dptº Microbiología Molecular	penalva@cib.csic.es	4358	200
- PÉREZ PRIETO, Sara Isabel	Tit.Sup.Esp.	Dptº Microbiología Molecular	saraip@cib.csic.es	4385	181
- PÉREZ-SALA GOZALO, Mª Dolores	Cient.Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	dperezsala@cib.csic.es	4402	74
- QUINONES GÓMEZ, Miguel A.	Cient.Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	maquinones@cib.csic.es	4364	107
- RAMÍREZ DE VERGER LOBO, Juan M.	Prof. Invest.	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	jmr Ramirez@cib.csic.es	4369	82
- REY CAMPOS, Fco. Javier	Cient.Titular	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	javier.rey@cib.csic.es	4416	18
- RIAL ZUECO, Eduardo	Cient.Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	rial@cib.csic.es	4236	78
- RISUEÑO ALMEIDA, Mª del Carmen	Invest. Cient.	Dptº Biología de Plantas	risueno@cib.csic.es	4230	55
- RIVAS CABALLERO, German	Cient.Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	grivas@cib.csic.es	4304	111
- RIVAS LÓPEZ, Luis I.	Cient.Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	luis_rivas@cib.csic.es	4234	90

NOMBRE	CATEGORÍA	DEPARTAMENTO	E-MAIL	TLF. -EXT.	PÁGINA
- RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, Santiago	Invest. Cient.	Dptº Inmunología	srdecordoba@cib.csic.es	4432	160
- RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, Ramón B.	Cient.Titular	Dptº Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	rbrod@cib.csic.es	4223	122
- RODRÍGUEZ MURCIA, Carlos	Invest. Cient.	Dptº Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.		915627622	117
- RODRÍGUEZ SAINT-JEAN, Silvia	Tit.Sup.Esp.	Dptº Microbiología Molecular	sylvia@cib.csic.es	4384	181
- ROJO HERNÁNDEZ, José María	Invest. Cient.	Dptº Inmunología	jmrojo@cib.csic.es	4217	128
- ROMERO GARRIDO, Antonio	Cient.Titular	Dptº Estruct. y Func. de Proteínas	romero@cib.csic.es	4244	82
- SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, Lucas	Invest. Cient.	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	lsanchez@cib.csic.es	4322	27
- SÁNCHEZ TESTILLANO, Pilar	Cient.Titular	Dptº Biología de Plantas	testillano@cib.csic.es	4365	55
- SCHVARTZMAN BLINDER J. Bernardo	Invest. Cient.	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	schvartzman@cib.csic.es	4233	2
- SERRA YOLDI, Mª Teresa	Cient.Titular	Dptº Biología de Plantas	mserra@cib.csic.es	4411	61
- SILVA GONZÁLEZ, Augusto	Cient.Titular	Dptº Inmunología	asilva@cib.csic.es	4431	148
- SUÁREZ GONZÁLEZ, Mª Teresa	Cient.Titular	Dptº Microbiología Molecular	teresa@cib.csic.es	4227	200
- TEIXIDÓ CALVO, Joaquín	Cient.Titular	Dptº Inmunología	joaquin@cib.csic.es	4392	138
- VIDAL CABALLERO, Miguel A.	Cient.Titular	Dptº Biología Cel. y del Desarrollo	myidal@cib.csic.es	4382	15

(Actualizado en enero de 2002)

(NOTA: El listado telefónico incluye los cuatro dígitos de la extensión cuando se marca la centralita del CIB, 91-564-45-62 salvo líneas directas indicadas por nueve dígitos)