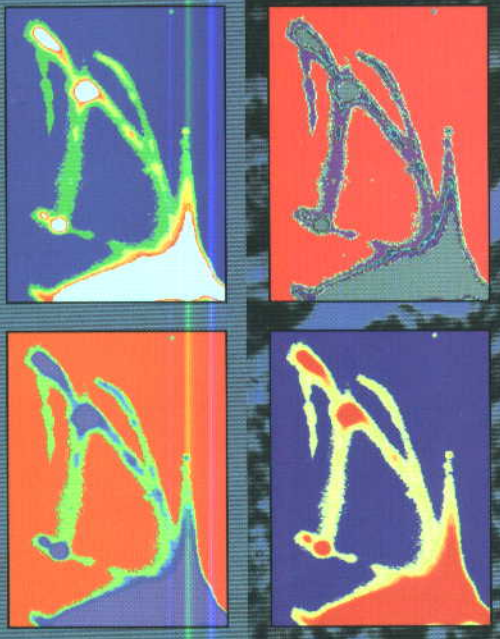
Centro de Investigaciones Biológicas

1997/1998



MEMORIA CIENTÍFICA 1997/1998

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

Espermatozoides de ratón diseminados sobre la superficie del oviducto. Microscopía electrónica de barrido. (Dr. P. Esponda).

Right picture

Mouse spermatozoa spread over the oviductal surface after natural mating. Scanning electron microscopy. (Dr. P. Esponda).

Recuadro:

Autorradiografía correspondiente a intermediarios de replicación de formas diméricas de pBR322 analizadas por electroforesis bidimensional en geles de agarosa luego de su digestión con *Eco*RI. El coloreado artificial de la imagen se realizó mediante Adobe Photoshop (*).

Insert :

*Artificial coloring (by Adobe Photoshop) of an autoradiogram corresponding to the analysis of replication intermediates of dimeric forms of pBR322, by two-dimensional (2D) agarose gel electrophoresis after digestion with Eco*RI (*).

*(Dr. J.B. Schvartzman)

Fondo: Estatua sita en el edificio del CIB
Background: *Sculpture located at the CIB building*

Coordinación Editorial: Ernesto García
Mª Victoria Lafita
Fco. Javier Medina
Jorge Bernardo Schvartzman

Diseño y maquetación: Carmen Eugenia Colilla de Iscar

Tabla de Contenidos

— Introducción V

Resumen de la actividad investigadora de los grupos

— **Dpto. de Biología Celular y del Desarrollo** 1
Control Genético del Ciclo Celular 2
Biología Molecular de los Cromosomas Eucarióticos 5
Reproducción Celular 9
Estrés y muerte celular 13
Regulación de la Expresión de Genes Eucariotas 16
Control Transcripcional en Eucariotas 19
Biología Celular y del Desarrollo de Nematodos 22
Citogenética Molecular 25
Biología del Desarrollo de *Drosophila* 28
Biología Molecular de la Gametogénesis 31
Biología de la Reproducción 37
Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados 39

— **Dpto. de Biología de Plantas** 43
Matriz Nuclear y regulación de la Organización y Función del nucleo 44
Nucleolo de Células Vegetales 49
Organización Nuclear durante el Desarrollo de Plantas 54
Progénesis de Virus de Plantas y Mecanimos de Resistencia en Plantas 59
Virología Molecular de Plantas 62
Entomología. Interacciones Planta-Insecto 64
Quimiorrecepción en Insectos 69

— **Dpto. de Estructura y Función de Proteínas** 73
Bioquímica y Biología Molecular del Óxido Nítrico 74
Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores 77
Biología Estructural de Proteínas 80
Biología molecular de Bacterias Gram-positivas 83
Bioquímica de Leishmania. Péptidos Antibióticos Eucarióticos 78
Las Proteínas de División Celular FtsZ y Tubulina como Máquinas Moleculares ..... .
de Ensamblaje y Dianas de Citostáticos 90
Parasitología Molecular 95
Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-positivas 97
Fotobioquímica Vegetal 101
Interacciones Macromoleculares. Proteínas del Citiesqueleto y Adhesión Celular 104

— **Dpto. de Fisiopatología y Genética Molecular Humana** 107
Fijación Directa del N_2 108
Genética Humana 109
Marcadores Tumorales y Procesos de Envejecimiento 111
Metabolismo y Patología Molecular 114
Microbiología Aplicada 117

— **Dpto. de Inmunología** 119
Activación de Linfocitos T 120
Adhesion Celular en el Sistema Inmune 124
Biología Celular de las Moléculas de Adhesión 127
Receptores de Membrana 131
Terapia del cáncer; Activación de los Macanismos de Apoptosis 135
Mecanismos Celulares de Acción de Taxoides Fluorescentes 139
Diferenciación de Linfocitos Humanos 141
Genética del Complemento 144
Virología Molecular de Vaccinia 149

— **Dpto. de Microbiología Molecular** 151
Biodegradación de la Lignina 152
Bioquímica de Hongos 157
Virología en Acuicultura 160
Carbohidratos Microbianos 163
Genética Bacteriana 167
Genética Molecular de *Aspergillus* 174
Iniciadores e Inhibidores de la replicación del DNA en Microorganismos 178
Biología Molecular de Hongos Basidiomicetos 181

— **Premios y Distinciones** 185
— **Organización de Congresos y Cursos** 187
— **Aula de Seminarios del Centro** 190
— **Personal de Servicios** 198
— **Organigrama CIB** 201
— **Jubilaciones y Nuevas Incorporaciones de Personal** 202
— **Resumen de Datos Económicos** 203
— **Evolución del número de Publicaciones y su Impacto** 204
— **Índice Alfabético de Investigadores y Teléfonos** 206

INTRODUCCIÓN

JUAN M. RAMÍREZ DE VERGER
Director

El Centro de Investigaciones Biológicas, fundado hace más de cuarenta años por Gregorio Marañón, es ya una institución clásica en la ciencia española que heredó el nombre y parte de la tradición científica del primitivo Laboratorio de Investigaciones Biológicas de Santiago Ramón y Cajal. En la actualidad el Centro acoge investigadores de las áreas de Biología y Biomedicina y de Ciencias Agrarias del CSIC y es uno de los mayores de la Institución. Como se describe con detalle en la presente memoria, en él se llevan a cabo variados proyectos de investigación de carácter tanto básico como biomédico o biotecnológico. Su considerable tamaño y la diversidad temática de sus proyectos son sus dos características más marcadas, y aunque la segunda pueda generar una imagen aparente de dispersión, el conjunto de ambas ofrece las ventajas obvias de enriquecer las posibilidades de interacción entre grupos de investigación y favorecer la pluralidad de abordajes experimentales.

No quiero ofrecer aquí un juicio, que sería lógicamente interesado, sobre la calidad de la actividad investigadora del Centro. Los datos que contiene esta memoria son suficientes para que cada uno pueda formar su propia opinión. Pero me gustaría hacer notar el importante papel que en la marcha normal del Centro interpretan sus Servicios Generales, administrativos y técnicos. Los primeros liberando al investigador, en la medida de lo posible, de las variadas y complejas tareas burocráticas anejas a la ejecución de los proyectos y permitiéndole optimizar su dedicación a la tarea propiamente investigadora. Los técnicos manteniendo funcionales el edificio y sus equipos e instalaciones, una labor a veces difícil ya que nuestra infraestructura no es, desgraciadamente, tan actual y funcional como sería de desear.

Además quisiera resaltar que el Centro pone a disposición de la comunidad científica sus servicios especializados, financiados en gran parte con fondos generados por el personal propio. Entre tales Servicios cabe destacar la Biblioteca, de las más completas entre las españolas de Biología fundamental, cuya informatización ha sido recientemente actualizada y completada mediante una generosa ayuda de la Fundación Ramón Areces. Las prestaciones realizadas a grupos externos no se limitan a las bibliográficas, sino que incluyen otras de carácter técnico entre las que se deben resaltar, por su alto grado de demanda exterior, las que ofrecen los servicios de química de proteínas (síntesis y secuenciación de polipéptidos), de secuenciación de ácidos nucleicos, de ultracentrifugación analítica y el laboratorio de espectroscopía (dicroismo circular y masas MALDI-TOF). Las facilidades instaladas en estos servicios y el resto de los comunes son accesibles sin trabas a los investigadores de otros centros.

Para terminar quisiera manifestar mi optimismo sobre las perspectivas del Centro para el próximo futuro. En primer lugar porque tras una prolongada etapa de escasas posibilidades para la incorporación estable de investigadores jóvenes, la Institución está llevando a cabo una política positiva de recursos humanos que todos deseamos ver consolidada en los próximos años y que contribuirá a aumentar sustancialmente la calidad de nuestro ambiente de trabajo y, consecuentemente, de nuestra actividad. Y en segundo lugar porque ya está próxima la entrega de la nueva sede del Centro en el campus de la Universidad Complutense. Además de la mejora de las condiciones técnicas, inherente al traslado a un moderno edificio de investigación, el cambio va a suponer una interacción más intensa con el entorno universitario y también una oportunidad para que reflexionemos sobre nuestra labor y la replanteemos para el futuro en el marco de las recientes tendencias del área, potenciando así la contribución del Centro a la investigación científica española.

INTRODUCTION

JUAN M. RAMÍREZ DE VERGER
Director

The Biological Research Center (CIB) is a classic of Spanish science, founded more than 40 years ago by Gregorio Marañón, and heir of both scientific tradition and name from the former Biological Research Laboratory of Ramón y Cajal. Presently the CIB houses staff scientists from the Biology-Biomedicine and Agricultural Sciences areas of the Spanish Higher Council for Scientific Research (CSIC), and is one of its largest institutes. As described in the present biennal report, the CIB carries out a variety of basic, biomedical and biotechnological research projects. The relatively large size of the Center and the diversity of its research interests are perhaps its more remarkable features. Both contribute to encourage interactions among research groups and to facilitate complementary experimental approaches.

I will not try to advance my own evaluation of the CIB activity. It would certainly be partial, and the data of this report will allow anyone to make his own judgement. But I should like to remark the important role played by the Central Services of the Center in relieving the scientific staff of bureaucratic burdens and in keeping in working order building, installations and instruments, often not as modern as desirable.

Besides, I should mention here that the CIB offers its specialized services to the Spanish scientific community. Among such services, mainly supported with funds raised by its own staff, the CIB has one of the best Spanish libraries of fundamental Biology, whose informatic system has recently been updated and extended with the generous financial support of the Ramón Areces Foundation. The services rendered to external groups are not only bibliographic. The instruments of the joint facilities of the CIB may be used by external groups, and so are most frequently those of the laboratories of protein chemistry polypeptide synthesis and sequencing DNA sequencing, analytical ultracentrifugation and spectroscopy CD and MALDI-TOF MS.

I should like to finish this introduction by expressing my confidence in the next future of the CIB. After several years with a low rate of staff changes, a positive policy of human resources has been started by the Institution. If it prevails, the input of young scientists will certainly renew and improve the quality of our work. Besides, new premises are being built for the CIB. In addition to moving to a more modern research building, with updated facilities, the change of location will offer us an opportunity to critically reflect on our own work and to plan our future activity under the newest trends of research in Biology, so that the CIB may improve its contribution to Spanish science.

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo
Department of Cell and Developmental Biology

Jefe de Departamento *Department Head*	**Dora B. Krimer Smunis** **Flora de Pablo Dávila** (Hasta X-1998)
Profesores de Investigación	**Gonzalo de la Torre García-Quintana** **Miguel Vicente Muñoz** (Hasta X-1998)
Investigadores Científicos	**José Luis Díez Cortes** **Pedro Esponda Fernández** **Flora de Pablo Dávila** **Lucas Sánchez Rodríguez** **Eduardo Torroja Cavanillas**
Científicos Titulares	**Patricio Aller Tresguerres** **Luisa Mª Botella Cubells** (Hasta IX-1997) **Jesús del Mazo Martínez** **Enrique de la Rosa Cano** **Clara Goday Baylina** **Pablo Hernández Valenzuela** **Dora B. Krimer Smunis** **Javier Rey Campos** **Jorge Bernardo Schvartzman Blinder** **Miguel Angel Vidal Caballero**
Personal Técnico	**Rosario de Andrés Montes** **Elena de Blas Brotons** **Margarita Carrascosa Cebrián** **Mercedes Casanova Esteban** (Hasta X-1998) **María Josefa Fernández-Cabrera Bazán** **Ascensión González Díaz** **Cristina Iglesias Guisasola** **Mercedes Jiménez Sarmiento** **José Luis Marcilla Cabanillas** **Mª Luisa Martínez Robles** **Dolores Mateos Moya** **Pilar Palacios Romero** (Hasta X-1998) **Amelia Parteарroyo Lacaba** **Virginia Quesada Guerrero** **Mª Pilar Robles González** **Luis Ruiz Pazos** (Hasta III-1997)
Secretaria	**Mª del Carmen Parteарroyo Lacaba**

Control Genético del Ciclo Celular
Genetic Control of the Cell Cycle

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

Ana Martínez-Hortigüela (Hasta IX-1998)
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

Jesús Mingorance
B. Postdoctoral / *Postdoctoral fellow*

María José Ferrándiz (Hasta XII-1997)
Lara Ferrero
Sonsoles Rueda
Lucía Yim (Hasta IX-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Mercedes Casanova
Pilar Palacios
Personal Técnico / *Technicians*

Beatriz Malik (Hasta III-1998)
Dolores Vallejo (Desde V-1998)
Secretarias / *Secretaries*

Herramientas biológicas para el control del crecimiento y la división

Blancos para inhibir las proteínas FtsA y FtsQ de *Escherichia coli*

Definiremos dominios dentro de las proteínas FtsA y FtsQ que sean esenciales para su actividad en la división celular. Se desarrollarán procedimientos para medir *in vitro* la capacidad de compuestos sinteticos para inhibir la actividad de estas proteínas. Estudiaremos asimismo sus actividades biológicas en relación con los otros componentes del septador. FtsA pertenece a la familia actina-hexokinasa, por lo que su estructura tiene un sitio de unión para ATP. FtsA se encuentra en la célula bien como una forma citoplásmica fosforilada en Thr215, o como forma no fosforilada asociada a la membrana (Sánchez *y col.*, 1994, EMBO J. 13, 4919-4925). Sobre las propiedades de FtsQ se conoce menos, pero se sabe que posee tres dominios, uno

Biological tools to control bacterial growth and division

Targets to inhibit the FtsA and FtsQ proteins of Escherichia coli

We will define domains in the E. coli septator proteins FtsA and FtsQ, which are essential for their activity in cell division. In vitro procedures will be developed to test the inhibitory activity of synthetic compounds on these proteins. In addition we will study the biological activities of these proteins in relation to the other components of the septator. FtsA belongs to the actin-hexokinase family and its structure contains therefore an ATP-binding site. In the cell FtsA is found as a cytoplasmic form that is phosphorylated on Thr215, or as an unphosphorylated cytoplasmic membrane-associated form (Sanchez et al., 1994 EMBO J. 13, 4919-4925). Much less is known on the biochemical properties of FtsQ, which has a cytoplasmic, a transmembrane and a periplasmic domain (Dopazo et al., 1992. Mol.

citoplásmico, otro transmembrana y el mayor que es periplásmico (Dopazo *et al.*, 1992. Mol. Microbiol. 6, 715-722). La célula tan solo contiene unas 25 moléculas de esta proteína.

Regulación de la expresión de genes esenciales de *E. coli*

Nuestro objetivo es obtener herramientas para controlar y modificar la expresión de los genes esenciales de la bacteria que intervienen en su crecimiento y en su división. Este conocimiento nos permitirá controlar mejor y de forma mas fina el comportamiento de los microorganismos, tanto en ambientes naturales como artificiales. Del resultado se beneficiarán en su conjunto las técnicas aplicadas al medio ambiente, a la sanidad y a la industria. Nos centraremos en el estudio de la regulación de la expresión génica en el agrupamiento *dcw* (*división and cell wall*) que contiene mas de una docena de genes cuyos productos intervienen en la síntesis de la pared bacteriana y del septo de división y que está filogenéticamente conservado en las bacterias (Vicente and Errington. 1996. Mol. Microbiol. 20, 1-7). Asimismo se estudiarán los mecanismos que controlan la transcripción de algunos promotores dependientes de σ^S que intervienen en la morfogénesis (*bolA1p*) y en la división celular (*ftsQ1p*) (Vicente *et al.*, 1991. Mol. Microbiol. 5, 2085-2091).

Regulation of expression of essential E. coli *genes*

Our objective is to supply tools to control and modify the expression of essential bacterial genes involved in the processes of cell growth and cell division. This knowledge will allow a better and finer control of the behaviour of microorganisms in natural and artificial environments, what will return profits for a variety of environmental, clinical and industrial applications. We will study the regulation of gene expression in the phylogenetically conserved dcw *cluster (division and cell wall) (Vicente and Errington. 1996. Mol. Microbiol. 20, 1-7), containing over a dozen genes that code for proteins involved in the synthesis of the bacterial wall or the division septum. The mechanisms operating in the transcription of some* σ^S *dependant promoters involved in morphogenesis* (bolA1p) *and cell division* (ftsQ1p) *(Vicente et al., 1991. Mol. Microbiol. 5, 2085-2091) will be studied.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CE. Cell Factory Contract. BIO4-CT96-0122 (Coordinador) (1996-1999).

— CICYT, 95-0057-OP (1996-1998).

— PNI, BIO97-1246 (1998).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **María José Ferrándiz Avellano.** Estructura y función de FtsA, una proteína esencial para la división de *Escherichia coli*. Universidad Complutense, 1997. Director: M. Vicente.

— **Manuel Ballesteros Simarro.** Elementos reguladores de la expresión *gearbox* a nivel transcripcional en *Escherichia coli*. Universidad Complutense, 1998. Director: M. Vicente.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Flärdh, K. Garrido, T., and Vicente, M. (1997) Contribution of individual promoters in the *ddlB - ftsZ* region to the transcription of the essential cell-division gene *ftsZ* in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. *24*, 927-936.

— Ballesteros, M., Kusano, S., Ishihama A., and Vicente, M. (1998) The *ftsQ1p* Gearbox promoter of *Escherichia coli* is a major sigma S-dependent promoter in the *ddlB-ftsA* region. Mol. Microbiol. *30*, 419-430.

— Buddelmeijer, N., Aarsman, M.E.G., Kolk, A.H.J., Vicente, M., and Nanninga, N. (1998) Localization of cell division protein FtsQ by immunofluorescence microscopy in dividing and non-dividing cells of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. *180*, 6107-6116.

— Flärdh, K., Palacios, P., and Vicente, M. (1998) Cell division genes *ftsQAZ* in *Escherichia coli* require distant *cis*-acting signals upstream *ddlB* for full expression. Mol. Microbiol. *30*, 305-315.

— Vicente, M., Gómez, M., and Ayala, J.A. (1998) Regulation of transcription of cell division genes in the *Escherichia coli dcw* cluster Cell. Mol. Life Sci. *54*, 317-324.

El grupo se trasladó al Centro Nacional de Biotecnología en septiembre de 1998. El trabajo descrito se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas en 1997 y 1998.

This group moved to the Centro Nacional de Biotecnología *during September 1998. The work described below has been done during 1997 and 1998 at the* Centro de Investigaciones Biológicas

Biología Molecular de los Cromosomas Eucarióticos
Molecular Biology of Eukaryotic Chromosomes

Jorge Bernardo Schvartzman Blinder
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Pablo Hernández Valenzuela
Dora B. Krimer Smunis
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Sylwia Srutkowska (IV-V, 1998)
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

David Santamaría Velilla
Natasha Vanegas Gómez
Alicia Sánchez Gorostiaga
Leticia Olavarrieta Scappini
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Mª Luisa Martínez Robles
Mª Pilar Robles González
Personal Técnico / *Technicians*

Iniciación, bloqueo y terminación de la replicación

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).

Initiation and Termination of DNA Replication

Keywords: Replication origins and termini, replication fork barriers, two-dimensional agarose gel electrophoresis, stereoisomers, knots, artificial chromosomes, bovine papillomavirus (BPV), Epstein-Barr virus (EBV).

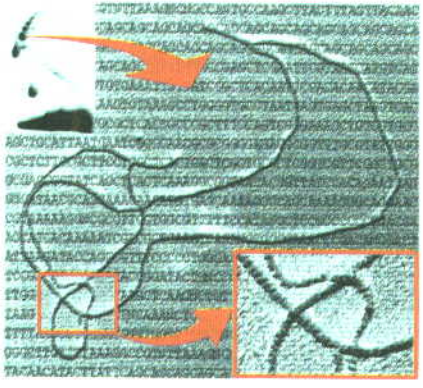


Figura: Visualización de un intermediario de replicación con una burbuja interna anudada. La muestra fue analizada por electroforesis bidimensional en un gel de agarosa luego de su digestión con *AlwNI* (ángulo superior izquierdo), enriquecida en los intermediarios indicados por el origen de la flecha, el DNA recubierto con la proteína recA y examinado al microscopio electrónico. En el ángulo inferior derecho se muestra un detalle a mayor aumento en el que se puede apreciar en cada cruce cuál de los segmentos pasa por arriba y cuál por abajo. (Microscopía electrónica: José Manuel Sogo, Zurich, Suiza).

Figure: Visualization of a replication intermediate containing a knotted internal bubble. The sample was analyzed by two-dimensional (2D) agarose gel electrophoresis after digestion with AlwNI (insert at the upper left corner), enriched for the intermediates indicated by the base of the arrow, the DNA coated with recA and examined under the electron microscope. The insert at the lower right corner corresponds to a higher magnification where it can be clearly noticed which segment goes above and which below at each individual crossing. (Electron microscopy: José Manuel Sogo, Zurich, Switzerland).

Desde 1987 nuestro grupo trabaja en la identificación de secuencias de DNA en las que se inicia y termina la replicación, tanto en sistemas procariotas como eucariotas. En los últimos 2 años hemos demostrado que en plásmidos con más de un origen, la iniciación de la replicación ocurre sólo en uno de ellos por ciclo de división. Este fenómeno se conoce como "interferencia entre orígenes", y su naturaleza es hasta hoy desconocida. En plásmidos con dos orígenes ColE1 enfrentados, el origen silencioso actúa como una barrera para el progreso de la horquilla iniciada en el otro origen, debido a la incapacidad de la helicasa DnaB de *E. coli* para desplazar el extremo 3' del RNA de los híbridos RNA-DNA. Esto explica por qué no existen en la naturaleza palindromes que contengan orígenes ColE1. El bloqueo de las horquillas da lugar a la acumulación de intermediarios de replicación con una burbuja interna, lo que permite que las topoisomerasas de tipo II generen nudos en la región ya replicada del plásmido. A diferencia de lo que ocurre en las formas no replicativas, en las que los nudos sólo tienen cruces ("nodes") de signo negativo, la gran mayoría de los cruces de los nudos de las burbujas acumuladas son de signo positivo. Por otro lado, también hemos desarrollado un programa informático que permite predecir los patrones generados por los intermediarios de replicación de cualquier fragmento lineal analizado por electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Finalmente, hemos caracterizado la migración de distintas familias de topoisómeros, moléculas anudadas, encadenadas e intermediarios de replicación de plásmidos intactos en geles bidimensionales.

Since 1987 we work in the identification of those DNA sequences where initiation and termination of DNA replication take place in prokaryotes as well as in eukaryotic organisms. We have shown that in bacterial plasmids containing more than one origin, initiation of DNA replication occurs at only one of the potential origins per replication round regardless of origins orientation. This phenomenon is called "origins interference" although its nature is still unknown. In those plasmids with inversely oriented origins, the silent origin acts as a polar pausing site for the replication fork initiated at the other origin. This stalling is due to the incompetence of Escherichia coli *DnaB helicase, which leads the replication fork in vivo, to unwind RNA-DNA hybrids. Stalling of replication forks leads to the accumulation of replication intermediates containing an internal bubble, which may serve as 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 in contrast to the nodes present is the knots of unreplicated plasmids, which have always negative signs. Besides, we developed a computer program to assist scientists in the prediction of the patterns expected for the replication intermediates (RIs) of any DNA fragment analyzed by neutral/neutral two-dimensional (2D) agarose gel electrophoresis and characterized the migration behaviour of different families of supercoiled, knotted molecules and catenanes.*

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

Palabras clave: Barreras de replicación del DNA, genes rRNA, terminación de replicación, terminación de transcripción, expansión de repeticiones de trinucleótidos, enfermedades neurodegenerativas.

En células eucarióticas, los efectos deletéreos de la colisión entre transcripción y replicación son evitados por la presencia de barreras polares para la replicación que impiden que los complejos replicativos que se mueven en el sentido contrario a la transcripción entren en una unidad transcripcional. Este es el

DNA replication arrest in eukaryotes and its relationship with dynamic mutations

Keywords: DNA replication barriers, rRNA genes, replication termination, transcription termination, trinucleotide repeats expansion, neurodegenerative diseases.

In eukaryotic cells, the deleterious effects of collision between transcription and replication are avoided by the presence of polar replication barriers. These barriers prevent replication complexes moving in the direction opposite to transcription to enter into transcriptional units. This is the case of the genes coding for ribosomal RNA (rDNA), where there is a temporal coincidence between transcription and replication. Our results

caso de los genes que codifican para el RNA ribosómico (rDNA), en los que hay una coincidencia temporal entre replicación y transcripción. Nuestros resultados indican que este bloqueo polar está mediado por proteínas específicas de unión a secuencias localizadas en la zona de la barrera que impiden el desplazamiento del replisoma por inhibición de alguno de sus componentes, probablemente la actividad DNA helicasa. En el caso del rDNA de ratón, la replicación parece ser bloqueada por el factor TTF-1, que a su vez está implicado en la terminación de la transcripción del rRNA por la RNA polimerasa I. Se trata, pues, de un sistema en el que los mismos factores en *cis* y en *trans* son capaces de detener la transcripción que proviene de posiciones *upstream* y la replicación proveniente de posiciones *downstream*. Estamos caracterizando este sistema utilizando *Schizosaccharomyces pombe* como modelo experimental.

indicate that this polar blockage is mediated by binding proteins that specifically recognize DNA sequences located in the barrier, arresting the replisome probably by inhibiting DNA helicase activity. In the mouse rDNA, replication seems to be blocked by the TTF-1 factor. This factor is also involved in the termination of rRNA transcription by RNA polymerase I. Therefore, it is a system in which the same cis*-acting and* trans*-acting factors are able to arrest transcription approaching from upstream and replication approaching from downstream, preventing head-on collision of both machineries. We are characterizing this mechanism by using* Schizosaccharomyces pombe *as model.*

Recientemente se ha descrito un tipo de mutaciones, denominadas dinámicas, que son las responsables de una serie de enfermedades hereditarias humanas. Consiste en la expansión del número de trinucleótidos repetidos localizados en algunos genes, cuya expresión se ve afectada en consecuencia. Nuestro objetivo es determinar el papel de la replicación del DNA en la formación de estas mutaciones. Hemos comprobado que en sistemas experimentales sencillos, estos trinucleótidos repetidos, pueden bloquear el desplazamiento del complejo de replicación, dependiendo de su orientación. Nuestros resultados indican que en las horquillas de replicación bloqueadas en estas secuencias ocurren procesos de deslizamiento de la cadena naciente, produciéndose una re-replicación de los trinucelótidos.

A new type of mutations, known as dynamic mutations, is responsible for a series of human hereditary diseases. These mutations consist in the expansion of the copy number of trinucleotide repeats located in some genes. This expansion alters the expression of the affected gene. Our objective is to determine the role that DNA replication plays in the formation of these mutations. We have found that in simple model systems these trinucleotide repeats block replication complex movement in an orientation dependent manner. Our results indicate that replication slippage of the nascent strand takes place in the arrested replication forks leading to the expansion of the trinucleotide repeats.

Identificación y clonaje de genes involucrados en la diferenciación celular

Identification and cloning of genes involved in erythroid differentiation

Palabras clave: Diferenciación eritropoiética, células eritroleucémicas, librerías de cDNA, hibridación diferencial, histonas.

Keywords: erythroid differentiation, murine erythroleukemia cells, cDNA libraries, differential hybridization, histones

Esta línea de investigación se centra en la identificación y aislamiento de genes involucrados en la diferenciación eritropoiética. Como modelo experimental de trabajo utilizamos la línea celular MEL ("murine erythroleukemia") o células Friend derivadas de progenitores eritroides cuya diferenciación ha sido

We use MEL (murine erythroleukemia) cells as a model system to identify genes involved in cell differentiation. MEL cells derive from erythroid precursors that have their differentiation pathway blocked. They can be induced to re-initiate differentiation by a number of treatments including hexamethylenbisacetamide (HMBA). Our main goal is to identify genes that are activated or repressed during the early steps of differentiation. We have used subtraction hybridization with complex cDNA probes synthetized with mRNAs isolated from undifferentiated and cells committed to differentiate to screen a cDNA library made with polyA+ mRNA from cells that were induced to differentiate with

bloqueada. Estas células pueden ser inducidas a reiniciar el proceso por medio de compuestos químicos entre los que destaca el hexametilenbisacetamida (HMBA). Nuestro objetivo principal es la identificación de genes cuya activación (o inactivación) tiene lugar durante los estadíos tempranos de la diferenciación o determinación celular. Hemos utilizado métodos de hibridación diferencial y/o substracción para barrer librerías de cDNA construídas a partir de mRNAs aislados de células MEL tratadas con HMBA. Se han identificado varios genes que presentan una expresión diferencial entre los que destacamos una proteina quinasa, las histonas H3.3A y H3.3B y la proteína ribosomal S5. Asimismo, se han aislado genes cuyas secuencias no presentan homología con las existentes en las bases de datos del GenBank/EMBL y que están siendo analizados con el objeto de comprobar su especificidad en tejidos eritroides y su posible papel en la diferenciación celular.

HMBA. We identified several genes showing a differential pattern of expression during differentiation. Among them those coding for a protein kinase, the H3.3A and H3.3B histones and the ribosomal protein S5. We also cloned several genes showing no homology with those registered at GenBank/EMBL. We are currently testing whether some of these genes are erythroid specific and their possible role in cell differentiation.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

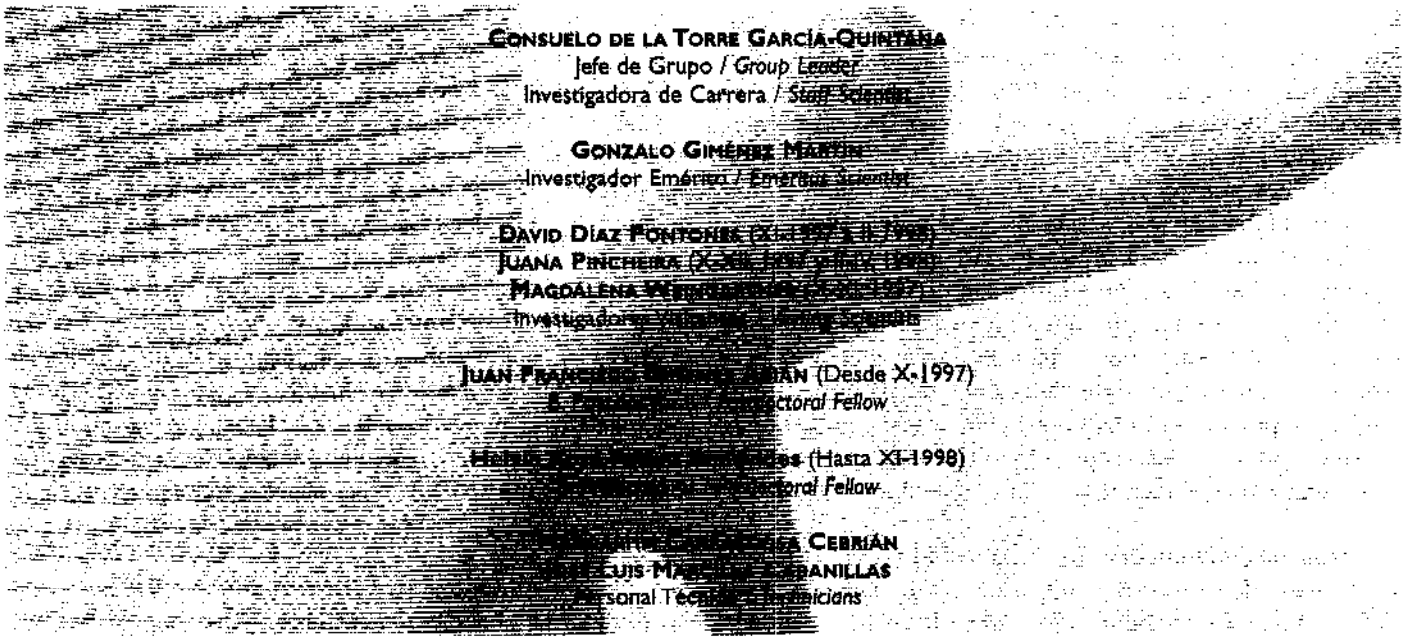
— CAM, 08.6/0016/1997 (1998-2000).
— CICYT, PM95-0016 (1996-1999)
— CICYT, PM97-0138 (1998-2001).
— FIS, 96/0470 (1996-1998).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— López-Alañón, D.M., López-Fernández, L.A., Castañeda, V., Krimer, D.B., and Del Mazo, J. (1997). H3.3A variant histone mRNA containing an α-globin insertion: Modulated expression during mouse gametogenesis correlates with meiotic onset. DNA Cell Biol. *16*, 639-644.
— López-Fernández, L.A., López-Alañón, D.M., Castañeda, V., Krimer, D.B., and Del Mazo, J. (1997). Developmental expression of H3.3A variant histone mRNA in mouse. Int. J. Dev. Biol. *41*, 699-703.
— Vanegas N., Castañeda, V., Santamaría, D., Hernández, P., Schvartzman, J.B., and Krimer, D.B. (1997). Cloning, sequencing and expression in MEL cells of a cDNA encoding the mouse ribosomal protein S5. Biochim. Biophys. Acta *1357*, 1-4.
— López-Estraño, C., Schvartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernández, P. (1998). Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA. J. Mol. Biol. 277, 249-256.
— Martín-Parras, L., Lucas, I., Martínez-Robles, M.L., Hernández, P., Krimer, D.B., Hyrien, O., and Schvartzman, J.B. (1998). Topological complexity of diferent populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 26, 3424-3432.
— Santamaría, D., de la Cueva, G., Martínez-Robles, M.L., Krimer, D.B., Hernández P., and Schvartzman, J.B. (1998). DnaB helicase is unable to dissociate RNA-DNA hybrids: its implication in the polar pausing of replication forks at ColE1 origins. J. Biol. Chem. 273, 33386-33396.
— Viguera, E., Rodríguez, A., Krimer, D.B., Hernández, P., Trellez O., and Schvartzman j.B. (1998). A computer model for the analysis of DNA replication intermediates by two-dimensional (2D) agarose gel electrophoresis. Gene *217*, 41-49.

Reproducción Celular
Cell Proliferation



Palabras clave: Proliferación celular, regulación por chequeo, replicación, genes ribosómicos 45S y 5S, genotoxicidad.

Keywords: Cell proliferation, cycle regulation by checkpoints, replication, 5S and 45S ribosomal genes, genotoxicity.

Regulación de la proliferación celular

El cromosoma es fuente de información (acción en *trans*), a la vez que actúa como receptor de señales (acción en *cis*). La irradiación (luz de 313 nm, hipoxia) del DNA bromado detectó secuencias dispersas en el genoma que asocian o excluyen proteínas que permiten o, alternativamente, interrumpen el paso de la célula a través de transiciones irreversibles del ciclo celular. Se probó que la señal que controla la desaparición de una banda de conexión entre cinetocoros hermanos actúa limpiamente en la segunda división meiótica, incluso en meiosis desinápticas.

La regulación por chequeo o regulación negativa (a cargo de los llamados genes supresores tumorales en mamíferos)

Regulation of cell proliferation

Chromosomes are the main source of information in the cell (action in trans), while they also work as signal receptors (action in cis). Irradiation (313 nm light under hypoxia) of cells with bromosubstituted DNA allowed us to detect dispersed sequences which associate or reject specific polypeptides (trans factors) which induced or, alternatively, precluded the passage of the cell throughout irreversible cycle transitions. It was proved that the signal which controls the disappearance of a connecting band between sister kinetochores selectively acts in the second meiotic division, even in desynaptic meioses.

Checkpoint regulation or negative regulation of proliferation (taking place by the so-called tumor supressor genes in

retrasa de forma temporal cualquier transición, obteniendo un tiempo adicional para completar un requisito previo a ella. Los bloqueos por chequeo son reversibles por definición ("hasta que el requisito se cumpla") y, además, porque si el requisito no es alcanzado en un tiempo concreto, dicho bloqueo acaba por ser indebidamente superado. Este grupo ha valorado, por primera vez, los tiempos de superación espontánea en diferentes rutas de chequeo, en *Allium cepa* L. Sus caducidades fueron: a) ocho horas, para la ruta que, al principio del periodo S, valora la capacidad de alcanzar una tasa de replicación normal, ruta que es activada en presencia de hidroxiurea, b) cuatro horas, para la que evalúa si toda la replicación nuclear ha terminado antes de permitir la iniciación de profase y c) dos horas, para la que condiciona la iniciación de la metafase a que el DNA esté individualizado en cromosomas independientes que puedan condensarse.

Mediante citofluorodensitometría de flujo (DNA, Br-DNA y valoración de tamaño celular), se determinó que la superación espontánea del bloqueo que la ruta de chequeo que responde a hidroxiurea produce al comienzo del periodo S se acompaña de un desbalance entre las constantes señales antimitogénicas producidas por la presencia continua de la droga y las señales mitogénicas en aumento que se producen en otra ruta de chequeo, corresponsable de esa transición, consecuencia del crecimiento del tamaño celular en presencia de la propia hidroxiurea. Ello excluye la interpretación de la superación de bloqueos por chequeo como adaptación de la célula a señales continuas.

Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes en células sincrónicas permitieron localizar las factorías tempranas de replicación. Estas se ensamblaban y activaban siguiendo un orden a lo largo de dominios cromosómicos específicos. Los genes nucleolares 5S se comportaron como un grupo de genes independientes de todos los demás, incluidos los otros genes nucleolares (precursores del 45S rRNA), ya que su replicación se produjo antes del inicio de la replicación general del núcleo y la replicación y transcripción de los genes 5S se mostraron insensibles tanto a 3' desoxiadenosina como al silenciamiento producido por la propia mitosis. Por último, las

mammalian cells) transiently delays any cycle transition, providind in this way an additional time to fulfill a previous requisite. The cycle blocks the checkpoint pathways induce is reversible by definition ("until the requisite is fulfilled"), but also because the block is finally overcome if such requisite is not achieved after a time. This group has been able to evaluate, for the first time, the time of spontaneous overcome for cycle blocks induced by different checkpoint pathways. Their overcome times were the following: a) eight hours, for the checkpoint surveying at the beginning of the S period the competence to reach a normal replication rate, pathway which is activated in the presence of hydroxyurea; b) four hours, for the checkpoint which controls all nuclear replication is over before licensing the induction of prophase, and c) two hours, for the checkpoint which conditions the triggering of metaphase to the complete individualization of DNA in independent chromosomes able to condense.

Flow flourodensitometry (DNA /Br-DNA / cell size) allowed us to determine that the spontaneous overcome of the block in early S produced by the pathway activated in the presence of hydroxyurea is accompanied by an important unbalance between the constant antimitogenic signals produced in the continuous presence of hydroxyurea against the increasing mitogenic signals produced by other pathway, co-responsible for that transition, which surveys the increasing cell size observed in the presence of this drug. It excludes the interpretation of checkpoint overcome as a cell adaptation to repeated signals or to intrinsic checkpoint frailty.

Fluorescent in situ hybridization allowed to localize early replication factories in synchronous cells. Factories were assembled and were activated sequentially along specific chromosomal domains. 5S ribosomal genes behaved as a set of genes independent from any other, included the nucleolar ones (45S rRNA precursor). Thus, the 5S genes replicated before any replication factory was assembled and before nuclear replication started. Moreover, they were insensitive to both the presence of 3' deoxyadenosine and to mitotic gene silencing mechanisms. Finally, early replication factories did not maintain any relationship with 5S gene domains.

factorías de replicación al comienzo del periodo S no guardaban relación aparente con los genes 5S.

Se detectaron señales posicionales de larga duración para el ensamblaje de estructuras microtubulares responsables del reparto cromósomico (huso mitótico) y de la división del citoplasma en la célula vegetal (fragmoplasto).

The presence of persistent signals operating in the positioning of microtubular assemblies responsible for chromosomal segregation (mitotic spindle) and the division of cytoplasm in the plant cell (phragmoplast) was proved.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— A. Integradas Austria-España (HU-1997-33) (1998-1999).
— CAM, BOCM (1997-1998).
— DGICYT, PB93-0167 (1995-1997).
— DGICYT, PB96-0909 (1997-1999).
— UE, BIOTECH - RTD PL96-0275 (1996-2000).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Helvia Rosa Pelayo Benavides.** La cancelación de bloqueos inducidos en el ciclo celular por rutas de chequeo, en plantas. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Directora: C. de la Torre.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Del Campo, A., Giménez-Martín, G., López-Sáez, J.F., and De la Torre, C. (1997). Frailty of two cell cycle checkpoints which prevent entry into mitosis and progression through early mitotic stages in higher plant cells. Eur. J. Cell Biol. *74*, 289-293.
— Giménez-Abián, J.F., Clarke, D.J., García de la Vega, C., and G. (1997). Giménez-Martín. The role of sister chromatid cohesiveness and structure in meiotic behaviour. Chromosoma *106*, 422-434.
— Giménez-Abián, M.I., Giménez-Martín, G., Navarrete, M.H., De la Torre, C. (1997). Microtubular structures developed in response to a carbamate herbicide in plant mitosis. Protoplasma *200*, 65-70
— Navarrete, M.H., Carrera, P., De Miguel, M., and De la Torre, C. (1997). A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plant cells. Mutation Res. *389*, 271-277.
— Panzera, F., Giménez-Abián, M.I., López-Sáez, J. F., Giménez-Martín, G., Cuadrado, A., Cánovas J.L., and C. De la Torre. (1997). Competence for nuclear replication and the NOR- chromosomes of *Allium cepa* L. Eur. J. Cell Biol. *72*, 9-12.
— Sans, J., Leyton, C., Giménez-Abián, M.I., Giménez-Abián, J.F., Aller, P., and De la Torre, C. (1997). Default cycle phases determined after modifying discrete DNA sequences in plant cells. Cell Prolif. *30*, 61-69.
— Carrera, P., De Miguel, M., López, J., De la Torre, C., and Navarrete, M.H. (1998). *In vivo* response of mouse liver to γ-radiation assessed by the comet assay. Mutation Res. *413*, 23-31.
— Clarke, D.J., Giménez-Abián, J.F., Tönnies, H., Neitzel, H., Sperling, K., Downes, C.S., and Johnson, R.T. (1998). Creation of monosomic derivatives of human cultured cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 167-171.
— Cuadrado, A., Pelayo, H.R., Giménez-Abián, M.I., Jouve, N., and De la Torre, C. (1998). Replication of 5 S ribosomal genes precedes the appearance of early nuclear replication complexes. Eur. J. Cell Biol. *77*, 247-252.

— Giménez-Abián, M.I., Panzera, F., López-Sáez, J.F., Giménez-Abián, J.F., De la Torre, C., and Giménez-Martín, G. (1998). Immediate disruption of spindle poles and induction of additional microtubule-organizing centres by a phenylcarbamate in plant mitosis. Protoplasma *204*, 119-127.

— Giménez-Abián, M.I., Utrilla, L., Cánovas, J.L., Giménez- Martín, G., Navarrete, M.H., and De la Torre, C. (1998). The positional control of mitosis and cytokinesis in higher plant cells. Planta *204*, 37-43.

— López-Sáez, J.F., De la Torre, C., Pincheira J., and Gimenez- Martín, G. (1998). Cell proliferation and cancer (A review). Histol. Histopathol. *13*, 1197-1214.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Giménez-Abián, M.I., Giménez-Abián, J.F., Cuadrado, A., Pelayo, H.R., Giménez-Martín, G., and De la Torre, C. (1998). The development of intraspecific dominance in some nucleolar organizer regions of plants. In Plant Cell Proliferation and its Regulation in Growth and Development, ed. J. Bryant and D. Chiatante, (Sussex, U.K.: John Wiley & Sons Ltd.), pp. 167-183.

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 (Desde V-1998)
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

Laura García Bermejo (Hasta X-1997)
María del Alba Galán García
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Pedro Oteo Bedoya (Hasta VI-1998)
Pregraduado / *Undergraduate student*

Elena de Blas Brotons
Personal Técnico /*Technician*

Palabras clave: Apoptosis, diferenciación, estrés, drogas antitumorales.

Nuestro laboratorio desarrolla un programa de investigación sobre la regulación de la apoptosis, diferenciación y respuesta de estrés en células superiores. Utilizamos células leucémicas mieloides (U-937, HL-60) y, ocasionalmente, otros tipos celulares (p.e., HeLa, HepG2).

Estamos estudiando la capacidad de agentes antitumorales (alquilantes, inhibidores de DNA topoisomerasas y de la replicación del DNA) e inductores de la respuesta de estrés (calor, metales pesados, etc.) para provocar la muerte (apoptótica y necrótica) y, en ciertas circunstancias, la diferenciación celular. Analizamos posibles mecanismos de regulación de estos procesos, a saber: (1) Cambios iónicos intracelulares (alteración de pH y movilización de Ca^{2+}). (2) Cambios en la expresión de genes específicos (tales como c-*jun*, c-*fos*, c-*myc*,

Keywords: Apoptosis, differentiation, stress, antitumour drugs.

We are currently investigating the regulation of differentiation, apoptosis and the stress response in higher cells. As a biological system we use myeloid leukemia cells (U-937, HL-60) and, occasionally, other cell types (e.g., HeLa, HepG2).

One of our projects consists in the study of the capacity of antitumour drugs (alkylating agents, DNA topoisomerase inhibitors and DNA replication inhibitors) and inducers of the stress response (heat-shock, heavy metals) to cause apoptotic and necrotic cell death and, under certain conditions, cell differentiation. We also investigate the mechanims which regulate these processes, such as (1) Intracellular ionic changes (pH alteration and Ca^{2+} mobilization). (2) Changes in the expression of specific genes, such as c-fos, c-jun, c-myc, bcl-2, bax, *and in the activity of specific transcripcion factors (AP-1, NF-κB). (3) Changes in the activity of MAPKs ("mitogen activated protein kinases"),*

bcl-2, *bax*) o en la actividad de factores transcripcionales (AP-1, NF-κB). (4) Cambios en actividades MAPKs ("*mitogen activated protein kinases*"), a saber: ERK1/ERK2, p38 y JNK/SAPK (4) Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y alteraciones en la función mitocondrial. (5) Activación de proteasas "tipo ICE" (caspasas).

Además, estamos investigando la posible modulación de la apoptosis por proteínas de estrés (también denominadas proteínas "*heat-shock*" o HSPs, especialmente la HSP70 y la HSP27), y analizando los mecanismos responsables de dicha modulación. Ello es importante, dado que algunos tipos de células tumorales presentan niveles constitutivamente elevados de HSPs. El incremento en el nivel de HSPs se obtiene por aproximaciones experimentales indirectas (pre-condicionando las células con un estrés suave) o directas (por transfección o infección con vectores portadores de los genes HSP70 y HSP27).

Por último, estamos interesados en analizar la posible regulación por el factor transcripcional HSF1 ("*heat-shock factor 1*") de la expresión de genes distintos a los clásicos genes "*heat-shock*", pero cuyo promotor también contiene secuencias consenso HSE ("*heat-shock element*", que une específicamente el HSF). Tal es el caso del gen *MDR1*, codificante de la glicoproteína P, máxima responsable del fenotipo de "resistencia múltiple a drogas". Ello se efectúa mediante técnicas de transfección o infección con vectores portadores del gen HSF1, y diversas construcciones mutadas del mismo.

namely ERK1/ERK2, p38 and JNK/SAPK. (4) Generation of reactive oxygen species (ROS) and alterations in mitochondrial function. (5) Activation of "ICE-like" proteases (caspases).

In addition, we are investigating the possible modulation of apoptosis by stress proteins ("heat-shock" proteins or HSPs, mainly HSP70 and HSP27), and the mechanims responsible for such modulation. This is important since some tumour cell types constitutively overexpress HSPs. The increase in HSPs levels is obtained by indirect (pre-conditioning with a soft stress) as well as direct (transfection or infection with HSP70- and HSP27-containing vectors) experimental approaches.

Finally, we are studying the possible regulation by the HSF1 transcription factor ("heat-shock factor 1") of the expression of genes other than classic HSP genes, the promoter of which contains the HSE consensus sequence ("heat-shock element", which specifically binds the HSF). This is the case of the MDR1 gene, which codifies the P-glycoprotein, the main reponsible for the "multidrug resistance" phenotype. This is carried out by infection or transfection procedures, using HSF1-containing vectors and differerent mutated constructs.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 07/060/96 (1997).
— CAM, 08.1/0027/1997 (1998-2000).
— DGESIC, PM97-0144 (1998-2001).
— DGICYT, PB94-0063 (1995-1998).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **María Laura García Bermejo.** Diferenciación y apoptosis de células promonocíticas humanas U-937: modulación por AMPc y posible implicación de la proteína de estrés HSP70. Universidad de Alcalá, 1997. Director, P. Aller.

Tesinas de Licenciatura / *Master Theses*

— **Pedro Oteo Bedoya.** Inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis en células promonocíticas U-937 por inhibidores de DNA topoisomerasa II con distinto mecanismo de acción. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Director: P. Aller.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Campión, J., Aller, P., Dávila, N., Carranza, M.C., De Miguel, R., and Calle, C. (1997). Tissue-specific modulation of insulin receptor mRNA levels in adrenaline-treated rats. Mol. Cell. Biochem. *169*, 165-169.
— García-Bermejo, L., Vilaboa, N.E., Pérez, C., Galán, A., De Blas, E., and Aller, P. (1997). Modulation by heat-shock protein 70 (HSP70) gene expression by sodium butyrate in U-937 promonocytic cells: relationships with differentiation and apoptosis. Exp. Cell Res. *236*, 268-274.
— Pérez, C., Vilaboa, N.E., García-Bermejo, L., De Blas, E., Creighton, A.M., and Aller, P. (1997). Differentiation of U-937 promonocytic cells by etoposide and ICRF-193, two antitumour DNA topoisomerase II inhibitors with different mechanisms of action. J. Cell Sci. *110*, 337-343.
— Sans, J., Leyton, C., Giménez-Abián, M.I., Giménez-Abián, J.F., Aller, P., and De la Torre, C. (1997). Default cycle phases determined after modifying discrete DNA sequences in plant cells. Cell Prolif. *30*, 61-69.
— Vilaboa, N.E., García-Bermejo, L., Pérez, C., De Blas, E., Calle, C., and Aller, P. (1997). Heat-shock and cadmium chloride increase the vimentin mRNA and protein levels in U-937 human promonocytic cells. J. Cell Sci. *110*, 201-207.
— García-Bermejo, L., Pérez, C., Vilaboa, N.E., De Blas, E., and Aller, P. (1998). cAMP increasing agents attenuate the generation of apoptosis by etoposide in promonocytic leukemia cells. J. Cell Sci. *111*, 637-644.
— Más, A., Campión, J., Aller, P., and Calle, C. (1998). Epinephrine-induced reduction in insulin receptor mRNA level and stability in U-937 human promonocytic cells. Horm. Metab. Res. *30*, 118-122.

Regulación de Expresión de Genes Eucariotas
Eukaryotic Gene Expression

Miguel Angel Vidal Caballero
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Camelia Marcos Gutiérrez (Desde II-1998)
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

García Pizarro, Emiliano
Lorente Pérez, M. Mar
Moreno Rodríguez, J. Carlos (Hasta I-1998)
B. Predoctorales / Graduate Students

Palabras clave: Genes Polycomb, Ring1, represión, ratones transgénicos.

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

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

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. The lab has also devoted part of its activity during this period to the identification of cis-acting

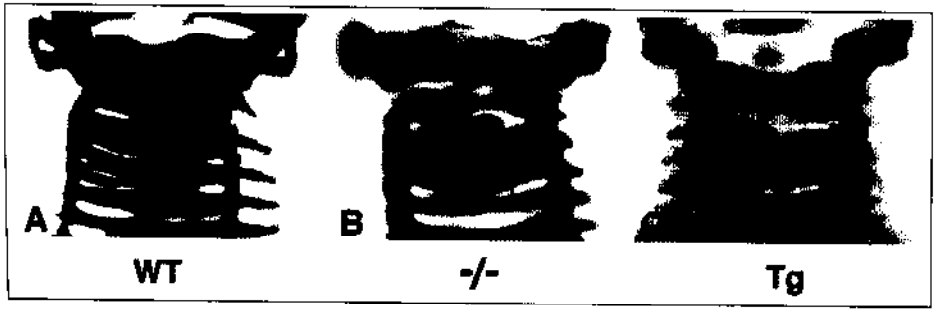


Figura: Preparaciones de esqueleto de la región cervical de ratones silvestres (A), Ring1A knockout (B) y transgénicos para Ring1A (C). Los ratones Ring1A knockout presentan anormalidades en el cartílago de la primera y segunda vértebras cervicales (B). En los ratones transgénicos para Ring1A, la segunda vértebra cervical ha tomado la identidad de la primera, dando lugar a una transformación anterior del esqueleto (C).

Figure: Skeletal preparations of the cervical region of wildtype (A), Ring1A knockout (B) and Ring1A transgenic (C) mice. Ring1A knockout mice display cartilage abnormalities in the first and second cervical vertebrae (B). In Ring1A transgenic animals, the second cervical vertebra has taken the identity of the first cervical vertebra resulting in an anterior transformation of the axial skeleton (C).

parte de la actividad del laboratorio durante este período se ha dirigido a la identificación de elementos de control en *cis* de la expresión de genes de queratinas en ratones transgénicos.

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

En la actualidad, el conocimiento de los mecanismos moleculares de la(s) función(es) de los genes Pc-G deriva en buena parte de trabajo en *Drosophila melanogaster*, el cual muestra que la represión mediada por proteínas Pc-G tiene lugar mediante la formación de complejos multiproteicos que participan en modificaciones de la estructura de la cromatina. A pesar del creciente interés, el conocimiento de la función Pc-G 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 Pc-G 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 Pc-G. A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los genes Pc-G de mamíferos, los genes Ring1A y Ring1B carecen de homólogos con función Pc-G en *Drosophila*. Para determinar si se trata de genes Pc-G 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 preliminar de estos animales muestra alteraciones homeóticas comparables a las producidas en otros genes Pc-G, lo que inequívocamente identifica las proteínas Ring1 como nuevos miembros del grupo Pc-G.

Identificación de elementos de control de genes de queratinas en ratones transgénicos

Para estudiar los elementos reguladores en *cis* de la expresión de los genes K8 (de epitelios sencillos) y K6 (capa suprabasal de epitelios estratificados) hemos generado ratones por-

sequences regulating keratin gene expression in transgenic mice.

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

Our understanding of the molecular mechanisms underlying Pc-G function(s) derives for the most part from work in Drosophila melanogaster. *It is believed that Pc-G repression is mediated by a chromatin-related mechanism through the oligomerization of Pc-G proteins multiprotein complexes. Despite an increasing interest, knowledge of Pc-G function in mammals is very limited. In the lab we have identified two new murine proteins, Ring1A and Ring1B, structurally related but encoded by differente genes. These proteins are transcriptional repressor that interact with Pc-G 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 Pc-G genes identified to date, the Ring1 genes lack a functional Pc-G homolog in* Drosophila. *We have started a functional analysis of Ring1 proteins in mice by generating both Ring1 overexpressing and Ring1 deficient mice (the latter in collaboration with T. Magin, Bonn). Preliminary characterization of these mutant animals has revaled homeotic transformations similar to those observed in mice with mutations in Pc-G genes, which strongly suggests that Ring1 proteins are new Pc-G members.*

Identification of cis control regions of keratin genes in transgenic mice

We have introduced into the germ line of mice a number of constructs based on sequences of the human K8 locus (specific of simple epithelial keratin) and of the bovine K6 gene (specific of the suprabasal layer of stratified epithelia). Starting from a 34 kb K8 cosmid clone we have shown that a 12 kb fragment (containing the gene together with 1.1 kb and 3.2 kb of flanking sequences) expresses efficiently in a position-independent and copy-dependent manner, typical of sequences with locus control activity. Further deletional analysis has shown that intragenic sequences are relevant to such an activity. In contrast, both constitutive and proliferation-inducible expression of the K6 gene are dependent of 5' flanking sequences.

tadores de diversas construcciones génicas. A partir de un cósmido que contiene 34 kb del locus K8 humano, hemos mostrado que un fragmento de 12 kb, conteniendo el gen junto con 1.1 kb y 3.2 kb de secuencias flanqueantes 5' y 3' respectivamente, muestra expresión eficiente, independiente de posición y relacionada con el número de copias, característicos de una actividad controladora de locus. Subsiguientes deleciones de este fragmento genómico muestran que elementos de control importantes se encuentran en secuencias intergénicas. Por el contrario, tanto la expresión constitutiva como la inducible (por estímulos proliferativos) del gen de la queratina 6 utiliza secuencias flanqueantes 5'.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— DGICYT, PB94-0089 (1995-1997).

— DGICYT, PB97-1238 (1998-2000).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Eduardo Felipe Were.** Análisis de las regiones reguladoras en *cis* de la expresión del locus de la queratina 8 humana en ratones transgénicos. Universidad Autónoma de Madrid. 1997. Director Miguel Vidal.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Schoorlemmer, J., Marcos-Rodríguez, C., Were, F., Martínez, R., García, M., Satjin, D., Otte, A., and Vidal. M. (1997). Ring1A is a transcriptional repressor that interacts with the Polycomb-M33 protein and is expressed at rhombomere boundaries in the mouse hindbrain. EMBO J. *16*:5930-5942.

— Ramírez, A., Vidal, M., Bravo, A., and Jorcano, J. (1998). Analysis of the sequences controlling tissue-specific and hyperproliferation-related keratin 6 gene expression in transgenic mice. DNA Cell Biol. *17*:177-185.

Control Transcripcional en Eucariotas
Control of Transcription in Eucariotes

Javier Rey Campos
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

María del Carmen Arias de la Fuente
María Ana Gómez Ferrería (Desde IX-1998)
Cristina Pérez Sánchez
Begoña Torres Belinchón (Hasta X-1997)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Luis Roiz Pazos (Hasta III-1997)
María Josefa Fernández-Cabrera (Desde XII-1997)
Personal Técnico / *Technicians*

El objetivo principal de nuestro laboratorio es el estudio de los mecanismos de control transcripcional en eucariotas superiores. Actualmente estamos llevando a cabo la caracterización estructural y funcional de dos nuevos factores de transcripción que hemos identificado en el laboratorio. Uno de estos factores, al que hemos denominado FHX, se expresa en varios órganos y tejidos humanos y de ratón. El segundo, lo hemos identificado en *Drosophila*. Ambos factores pertenecen a la misma familia de factores de transcripción conocida como Forkhead/HNF3 o *Winged helix*, cuyos prototipos son el gen *Forkhead* de *Drosophila* y los factores de transcripción hepáticos HNF3 de vertebrados.

FHX, *Forkhead Homologous X*, fue identificado inicialmente en hígado fetal humano, aunque su expresión es mucho más amplia, detectándose su mRNA en muchos tejidos y órganos humanos. Sin embargo, FHX no se trata de un factor ubicuo, por cuanto su expresión se restringe, normalmente, a solo algunos tipos celulares en cada tejido u órgano donde se ha detectado su expresión. FHX muestra un dominio de unión al DNA del tipo *winged helix* o *Forkhead*, por esta razón se encuadra dentro de esta familia de factores de transcripción. Sin embargo, el

The main line of research of our laboratory is the study of the molecular mechanisms of transcriptional control in higher eucariotes. Currently, we are working on the characterization of the structure and function of two novel transcription factors we have found in our laboratory. One of these factors, which we have named as FHX, is expressed in several tissues and organs, in humans and in the mouse. The other transcription factor was found in Drosophila. *Both factors share homology with members of the Forkhead/HNF3 family of transcription factors, also known as Winged helix factors, prototypes of which are the* Drosophila *gene* Forkhead, *and the hepatic transcription factors HNF3, from vertebrates.*

FHX, Forkhead Homologous X, *was first found in human fetal liver, although its expression is much broader. The FHX mRNA is detected in many human tissues and organs. However, FHX cannot be considered as an ubiquitous factor, since its expression is usually restricted to some cell types within each organ or tissue. The* Forkhead *domain of FHX shows several amino acid residues that are specific and are not found in any other member of the Forkhead/HNF3 family of transcription factors. This suggest that FHX has evolved somehow separately of*

dominio *Forkhead* de FHX presenta aminoácidos característicos que no se encuentran en ningún otro miembro de esta extensa familia, situándolo en una rama evolutiva separada del resto de los factores Forkhead. FHX se une al DNA de una manera específica. Mediante experimentos de selección de sitios por PCR hemos identificado las secuencias de DNA reconocidas por FHX. Estas secuencias nos han permitido definir una secuencia consenso de reconocimiento de FHX, la cual está presente en muchos genes de vertebrados. Aún no sabemos, sin embargo, cuales de estos genes son realmente regulados por FHX.

En experimentos de transfección transitoria, FHX se comporta como un activador transcripcional. La actividad de FHX podría estar regulada mediante dos posibles mecanismos. Por un lado, FHX puede expresarse como dos isoformas distintas que difieren en los últimos aminoácidos de sus extremos C-terminales. Estas dos isoformas, FHX.S y FHX.L, tienen diferentes capacidades de activación de la transcripción, lo que sugiere que el extremo C-terminal más largo y exclusivo de la isoforma FHX.L, podría contener un dominio de transactivación extra no presente en la isoforma más corta, FHX.S. Por otro lado, la secuencia no traducida del extremo 5' del mRNA de FHX podría adoptar una estructura secundaria especialmente complicada, lo que dificultaría la traducción de este mRNA. Hemos encontrado que, efectivamente, esta estructura disminuye notablemente la actividad de FHX en experimentos de transfección. Esto sugiere que la traducción del mRNA de FHX podría estar regulada, dependiendo de factores específicos, que facilitasen el desplazamiento del ribosoma a través de esta región 5' no traducida. Un corolario que se deriva de estas dos formas posibles de regulación de la actividad de FHX es que, la mera expresión del mRNA para este factor no implica la expresión de su función. Actualmente, estamos investigando el posible papel que desempeña FHX en el testículo y en el ovario, donde su expresión se restringe a ciertos tipos celulares, exclusivamente.

Recientemente, hemos encontrado un nuevo factor de transcripción, de esta misma familia, en *Drosophila*. Este factor muestra un dominio de unión al DNA de tipo *Forkhead* que muestra una homología mayor con los factores FREAC-1/2 de mamíferos.

the main evolutionary branch of the Forkhead *genes. FHX binds DNA specifically. We have determined the optimum DNA recognition sequence, by PCR-site selection experiments. This allowed us to define a consensus sequence that is found in many genes from vertebrates. However, we do not know whether the expression of these genes is indeed regulated by FHX.*

Transient transfection experiments showed that FHX is a transcriptional activator. We have found that the FHX activity might be regulated by two possible mechanisms. On the one hand, two different isoforms of FHX, FHX.S and FHX.L, may exist which differ in a few amino acids at their C-terminal end. These two isoforms showed different capacities of activating transcription, suggesting that the larger C-terminal end of FHX.L might include a transactivation domain not present in the shorter form, FHX.S. On the other hand, we have computer modelled the secondary structure of the 5'-untranslated region, 5'UTR, of the FHX mRNA. We found that it could fold in a highly stable complex structure that could hamper translation of the FHX mRNA. In fact, this region notably decreased the activity of FHX in transfection experiments. We speculate that the translation of the FHX mRNA might be regulated, depending on specific factors which would facilitate the scanning of the small subunit of the ribosome through this 5'UTR. A conclusion that can be drawn from these two potential mechanisms of regulation of the FHX activity is that the mere expression of the FHX mRNA does not presuppose the expression of the FHX function.

Currently, we are addressing the characterization of the role of FHX in the testes and in the ovaries, where its expression appears to be restricted to distinct cell types. Quite recently, we have found another novel Forkhead *transcription factor from* Drosophila *whose DNA binding domain shows homology to mammals FREAC1/2 factors.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 08.9/0006/1998 (1998-2000).

— DGICYT, PB93-0312 (1994-1997).

— DGICYT, PM96-0005 (1997-2000).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Chouard, T., Jeannequin, O., Rey-Campos, J., Yaniv, M., and Traincard, F. (1997). A set of polyclonal and monoclonal antibodies reveals major differences in post-translational modification of the rat HNF1 and vHNF1 homeoproteins. *Biochemie. 79*, 707-715.

— Lamas, M., Rey-Campos, J., and Silva, A.G. (1997). Identification of a novel glucocorticoid response unit (GRU) in the 5'-flanking region of the mouse IL-2 Receptor a gene. *Cytokine 9*, 973-981.

Biología Celular y del Desarrollo de Nematodos
Developmental and Cellular Biology of Nematodes

Clara Goday Baylina
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigadora de Carrera / *Staff Scientist*

Denise Selivon (X-1997)
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

Rosario Esteban Fernández
Yanina Panzera
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Mercedes Jiménez Sarmiento
Personal Técnico / *Technician*

I. El propósito de este proyecto es la identificación, caracterización citológica y molecular de proteínas involucradas en la segregación de los cromosomas y en la citocinesis en organismos eucariotas. Se parte de anticuerpos monoclonales generados contra extractos proteicos de células en división del nematodo *Parascaris*. Dichos anticuerpos reconocen antígenos asociados a los cromosomas y a diferentes componentes del huso microtubular. Usando técnicas de inmunofluorescencia, se ha estudiado la conservación evolutiva a nivel celular de los antígenos en diferentes sistemas como son levaduras, nematodos, *Drosophila melanogaster* y mamíferos. 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 desde el punto de vista molecular y para algunos de ellos se ha iniciado el análisis genético mutacional en los sistemas *Drosophila* (colaboración con los Drs. P. Ripoll y A. Villasante, CBM) y *Schizosaccharomyces pombe* (colaboración con el Dr. Carlos Gancedo, I.I.B.).

I. The aim of the project is to identify and molecularly characterize proteins involved in chromosome segregation and in cytokinesis in eucariotic cells. We are using monoclonal antibodies generated against mitotic cells proteic extracts of the nematode Parascaris. *The antibodies recognize antigens that associate to chromosomes and spindle components. By immunofluorescence techniques, we have studied the conservation and cell distribution of the antigens in distant organisms like yeast, nematodes,* Drosophila melanogaster *and mammal cells. 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 of some of them in* Drosophila *(in collaboration with Drs. P. Ripoll and A. Villasante, CBM) and in fission yeast (in collaboration with Dr. C. Gancedo, I. Biomédicas).*

1. In Parascaris, mAb 403 recognizes an antigen that associates to the spindle (centrosomes and kinetochore-microtubules)

1. El anticuerpo mAb 403 reconoce en *Parascaris* un antígeno asociado a elementos del huso (centrosomas, y microtúbulos cinetocóricos) y al centrómero en células mitóticas y meióticas. Se trata de una proteína de 227 kD (PUMA1) cuya presencia en el centrómero depende de la integridad de los microtúbulos del huso. Esta proteína presenta dos dominios globulares en los extremos, separados por una larga región central organizada en alfa-hélice lo cual, es típico de proteínas que organizan filamentos enrollados (*coiled-coil*). La asociación de mAb 403 a elementos del huso mitótico se observa en las diferentes especies estudiadas. Se ha clonado el gen codificante para el antígeno correspondiente en *Drosophila*. Se trata de un gen no descrito y la proteína deducida de 70 kD presenta una estructura secundaria homóloga a la descrita en *Parascaris*. Además, dicha proteína presenta un dominio motor central característico de proteínas motoras tipo kinesinas. Actualmente se esta estudiando un mutante del gen identificado en *D. melanogaster*.

2. El anticuerpo mAb 224 reconoce en *Parascaris* y en *Drosophila* un antígeno asociado a los centrosomas y a los microtúbulos del huso mitótico. En células de mamífero y en *Schizosaccharomyces pombe*, el antígeno se asocia a la región ecuatorial correspondiente al anillo contráctil y al septo de división de la célula, respectivamente. Se trata de una proteína de 205 kD cuyo gen identificado en *D. melanogaster* es el gen *zipper*, ya descrito, que codifica para la cadena pesada de la miosina citoplásmica (miosina II). Se demuestra la presencia de miosina II en los centrosomas y los microtúbulos del huso en *Drosophila melanogaster*.

3. El anticuerpo mAb 337 reconoce un antígeno de 100 kD asociado a los centrosomas y al huso medio y cuya localización está conservada en *P. univalens*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y células de mamífero. El análisis molecular del gen identificado en *Drosophila* reveló que se trata de una nueva proteína caracterizada por contener múltiples dedos de zinc.

4. El anticuerpo mAb 8 reconoce un antígeno conservado que se asocia a los centrosomas y a la región ecuatorial durante la citocinesis. Se ha identificado el gen en *Parascaris* y la proteína corresponiente de 80 kD es de tipo miosina. Así mismo, en *S. pombe* se aisló el gen correspondiente. Dicho gen codifica para un proteína de 142 kD (Alm1) de tipo miosina. Se ha

and to the centromere in mitotic and meiotic cells. This protein (PUMA1) of 227 kD is present at the centromeres depending on the existence of intact spindle microtubules. It contains two globular domains spaced by a large α-helical central region as found in coiled-coil proteins. mAb 403 associates to spindle components in the different species analyzed. The gene responsible for this antigen has been cloned in Drosophila *and the secondary structure of the 70kD predicted protein is similar to that described in* Parascaris. *Moreover, the protein exhibits a central motor domain typical of kinesin motor proteins. We are currently analyzing a mutant of this gene identified in D. melanogaster.*

2. *In* Parascaris *and* Drosophila, *mAb 224 recognizes an antigen that associates to the centrosomes and mitotic spindle microtubules. In mammalian cells and* Schizosaccharomyces pombe *the antigen is located at the ecuatorial region of the cells and at the division septum, respectively. A 205 kD protein has been identified and the encoding gene has been isolated in D. melanogaster. This gene is identical to the previously described gene zipper that codifies for the heavy chain of citoplasmic myosin (myosin II). We demostrate that myosin II is a component of the centrosomes and is associated to the spindle microtubules in* Drosophila melanogaster.

3. *In* P. univalens, C. elegans, D. melanogaster *and mammalian cells, mAb 337 recognizes a 100 kD antigen. The characterization of this antigen that associates to the centrosomes and to the middle spindle at anaphase has been carried out in* Drosophila. *A new protein containing multiple zinc finger motives has been identified.*

4. *mAb 8 reveals a conserved antigen that associates to the centrosomes and to the ecuatorial region during cytokinesis in all the species studied. A new gene has been identified in* Parascaris *and a myosin-like 80 kD protein has been described. Moreover, in* S. pombe *a gene encodifying to a myosin-like 142 kD protein (Alm1 protein) has been characterized. We are currently analyzing a S. pombe mutant of this gene.*

II. We are also interested in the peculiar chromosome behavior due to the existence of genomic imprinting in the insect Sciara ocellaris. *In this project we have cytologically characterized the process of paternal chromosomes elimination during male meiosis I, as well as, non-disjunction of maternal X chro-*

procedido a obtener un mutante de dicho gen en *S. pombe* que actualmente se está estudiando.

II. Estamos también interesados en el comportamiento de los cromosomas sometidos a un fenómeno de *imprinting* en el insecto *Sciara ocellaris* En este proyecto, hemos caracterizado citológicamente el proceso de eliminación de los cromosomas paternos durante la meiosis I masculina, así como la no-disyunción del cromosoma X materno durante la meiosis II. Se ha demostrado, así mismo, el papel ejercido por los microtúbulos y los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) en dicho proceso. Por otra parte, se ha iniciado el estudio de la eliminación del cromosoma X de las células germinales en embriones de *Sciara.*

mosome during meiosis II. Moreover, we have investigated the role of microtubules and microtubules organizing centers (MTOCs) in these processes. We have also undertaken the study of X chromosome elimination from germ cells in Sciara *embryos.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— DGICYT, PB96-0810 (1997-2000).
— DGICYT, UE95-0035 (1995-1997).
— NATO, CRG 970224 (1997).
— UE, CII*-CT94-0071 (1995-1997).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

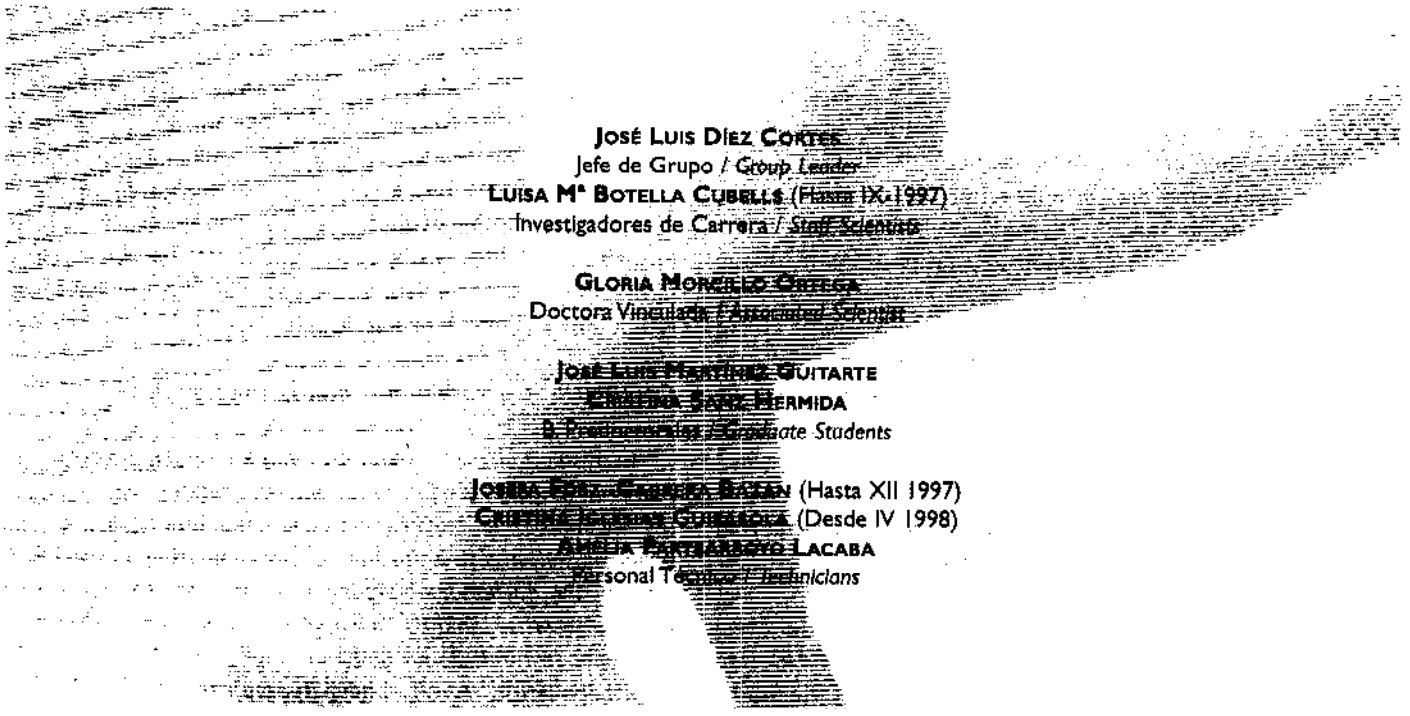
— **Yanina Panzera Crespo.** Caracterización de proteínas asociadas al huso durante la división celular en organismos eucariotas. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Directores: C. Goday y M.R. Esteban.
— **Mercedes Jiménez Sarmiento.** Caracterización de dos nuevas proteínas implicadas en la división celular. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Director: C. Goday.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Esteban, M.R., Campos, M.C.C., Perondini, A.L.P., and Goday, C. (1997). Role of microtubules and microtubule organizing centers on meiotic chromosome elimination in *Sciara ocellaris*. J. Cell Sci. *110*, 721-730.
— Esteban, M.R., Giovinazzo, G., De la Hera, A., and Goday, C. (1998). PUMA1: A novel protein that associates to the centrosomes, spindle and centromeres in the nematode *Parascaris*. J. Cell Sci. *111*, 723-735.

Citogenética Molecular
Molecular Cytogenetics



José Luis Díez Cortés
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Luisa Mª Botella Cubells (Hasta IX-1997)
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Gloria Morcillo Ortega
Doctora Vinculada / *Associated Scientist*

José Luis Martínez Guitarte
Cristina Sanz Hermida
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Josefa Fdez. Cabrera Bazán (Hasta XII 1997)
Cristina Iglesias Guisasola (Desde IV 1998)
Amelia Partearroyo Lacaba
Personal Técnico / *Technicians*

Organización telomérica en *Chironomus thummi*

El mecanismo de elongación telomérica en *Chironomus*, como en otros Dípteros, difiere del más comúnmente conservado, basado en la acción de la telomerasa sobre secuencias teloméricas de pequeño tamaño. En *Chironomus thummi*, los telómeros están formados por bloques de secuencias repetidas de 175 bp, cuya transcripción puede ser activada mediante choques térmicos y otros tratamientos de estrés. Esta activación se manifiesta a nivel citológico por la formación de puffs teloméricos denominados TBRs. El objetivo principal de esta investigación es profundizar en el conocimiento de la organización molecular de los telómeros con el fin de encontrar las bases moleculares de su inducibilidad por tratamientos térmicos. Estos estudios pueden contribuir al conocimiento de los mecanismos de elongación telomérica, pobremente entendidos en estos organismos.

Telomeric organization in Chironomus thummi

The mechanism of telomeric elongation in Chironomus, as in other Dipteran studied so far, differ from the most conserved one based on telomerase activity acting on short telomeric sequences. In Chironomus thummi, telomeres are organized in blocks of 175 bp tandem repeated sequences, whose transcription can be activated by heat-shock and other stress treatments. Telomeric activation leads to the formation of terminal puffs, called TBRs. The main goal of this research is the molecular characterization of these telomeres to find out the bases for their response to thermal treatments. Besides, these studies may help to elucidate how telomeres elongate in this organism.

Localización cromosómica de proteínas implicadas en procesos de transcripción

La posibilidad de visualizar citologicamente la presencia de determinados factores proteicos en dominios cromosómicos transcripcionalmente activos o experimentalmente activables, constituye una clásica aplicación de los cromosomas politénicos, que no puede ser llevada a cabo en células interfásicas ordinarias. La localización de una proteína mediante técnicas inmunocitoquímicas proporciona un primer nivel de información sobre su posible función en los procesos objeto de estudio. A lo largo del bienio, la investigación se ha centrado en la localización cromosómica de las proteínas de estrés así como en la identificación de proteínas relacionadas con la inducción de puffs teloméricos (TBRs).

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

En este período, se ha iniciado una nueva línea de investigación que intenta explorar las posibilidades de los cromosomas politénicos en el análisis de las relaciones dinámicas existentes entre la estructura de la cromatina y la transcripción. En una primera aproximación, el estudio se ha centrado, en comparar las alteraciones de la organización nucleosomal en genes transcritos por RNA polimerasa I y II. Esta aproximación se basa en el uso de los anillos de Balbiani, cuyas características tanscripcionales, especialmente la alta densidad de RNA pol II y la elevada tasa de transcripción, les hace comparables a la del sistema ribosomal, transcrito por RNA pol I. Este planteamiento permite estudiar de forma simultanea ambos sistemas de transcripción, en las mismas células, utilizando el mismo método de análisis (*Psoralen Cross-linking Assay*).

Chromosomal localization of transcription-related proteins

Polytene chromosomes, unlike normal interphase nuclei, allow the cytological detection of protein factors associated to transcribing chromosomal domains. The immunolocalization of a given protein in active chromosomal loci may give a first level of information about its function in the process under study. In this period, this kind of studies were focused on the chromosomal localization of stress proteins as well as to identify proteins involved in the induction of telomeric puffs (TBRs).

Chromatin structure and transcriptional activity

In this period, we have initiated a new research project whose aim is to asses the usefulness of polytene chromosomes to study the dynamic relationships between chromatin structure and transcription. In a first attempt, we are comparing the modifications of the nucleosomal organization in genes transcribed by RNA polymerase I and II. This approach is based on some transcriptional features of the Balbiani rings transcribed by Pol II. High polymerases density along Brs with their elevated transcription rate make them comparable to the ribosomal genes, transcribed by Pol I. This approach allow to simultaneously study both transcription systems, in the same cells, using the same method of analysis (Psoralen Cross-linking Assay).

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

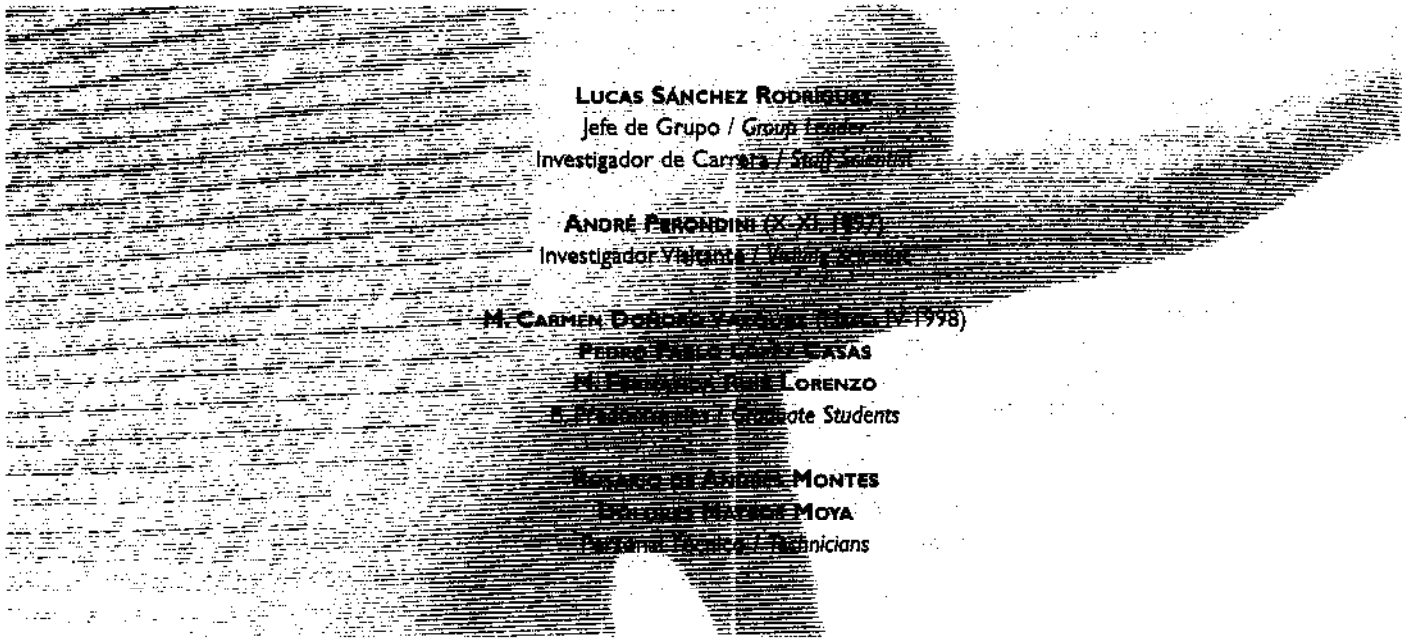
— DGICYT, PB 94-0024. (1995-1998).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Morcillo, G., Gorab, E., Tanguay, R.M., and Díez, J. L. (1997). Specific intranucleolar distribution of Hsp 70 during heat shock in polytene cells. Expt. Cell. Res. 236, 361-370.

Biología del Desarrollo de *Drosophila*
Developmental Biology of Drosophila



Palabras clave: *Drosophila*, *Sciara*, determinación sexual, compensación de dosis génica, disco genital, híbridos interespecíficos, análisis lógico-generalizado.

Se han obtenido moscas transgénicas de *D. melanogaster* portadoras de genes quiméricos para la proteína SXL y el factor general de "*splicing*" U2AF. El análisis de estos transgenes ha revelado que la proteína SXL regula diferentemente el "*splicing*" de su propio RNA, y el del RNA del gen *transformer*.

Se están aislando y caracterizando en *S. ocellaris* los genes homólogos de *D. melanogaster* implicados en determinación sexual y/o compensación de dosis génica. 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. Se expresión es generalizada y durante todo el desarrollo de ambos sexos. La prote-

Keywords: Drosophila, Sciara, *sex determination, dosage compensation, genital disc, interspecific hybrids, generalised logical formalism.*

The use of D. melanogater *transgenic flies, expressing chimeric proteins between SXL and the general splicing factor U2AF, revealed that SXL regulates differently the splicing of its own RNA and that of the gene* transformer.

We are searching, and characterising the genes in S. ocellaris *which are homologous to the genes controlling sex determination and/or dosage compensation in* D. melanogaster. *The cloning and characterisation of the* maleless (mle) *gene of* S. ocellaris *and its comparison with* mle *of* D. melanogaster *has been performed. The* Sciara mle *gene encodes a single transcript, which is present in both male and female adults and larvae, and codes for a protein showing a high degree of conservation with the* Drosophila MLE *protein. The affinity-purified antibody against the* D. mela-

ína MLE de *S. ocellaris* tiene una gran homología con MLE de *D. melanogaster*. El anticuerpo purificado por afinidad contra MLE de *D. mealnogaster* (anti-MLE) reconoce una única banda en *S. ocellaris*, de un tamaño correspondiente a la unidad de transcripción del gen *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. Estos resultados sugieren que el gen *mle* de *S. ocellaris* no está involucrado en compensación de dosis génica.

Se ha analizado la organización segmental del disco genital de *D. melanogaster*. Los resultados demuestran que los tres primordios que forman el disco genital, los primordios genitales de macho y hembra, y el primordio anal, están compuestos de un compartimento anterior y uno posterior. La expresión de los genes homeóticos, *abdominal-A* y *Abdominal-B*, sugieren una organización parasegmental del disco genital, aunque no es descartable que estos genes cambien su patrón de expresión durante el desarrollo larvario. El análisis del patrón de expresión de los genes *decapentaplegic*, *wingless*, *hedgehog* y *patched*, demuestran que el disco genital está organizado de una manera similar a los discos de antena y pata: los genes *decapentaplegic* y *wingless* actuarían como organizadores generales del desarrollo del disco genital. Se propone, además, que el control de la proliferación de los primordios genitales de ambos sexos requiere la acción concertada de los genes *Abdominal-B* y *doublesex*, los cuales, directa o indirectamente, regulan la expresión de los genes *decapentaplegic* y *wingless*.

El estudio de híbridos interespecíficos entre especies del grupo Melanogaster, han demostrado la existencia de distintas barreras de aislamiento reproductor. Se propone que dichas barreras son el resultado de la alteración de sistemas genéticos coadaptados de las especies.

Mediante la aplicación del análisis lógico-generalizado, se ha estudiado la organización del patrón dorso-ventral duran-

nogaster *MLE protein (anti-MLE) recognises a unique protein in* S. ocellaris. *This antibody has been used to analyse the polytene chromosome distribution of MLE protein in* S. ocellaris. *In contrast to* Drosophila, *where the MLE protein is preferentially associated with the male X chromosome, in* Sciara *the MLE protein is found in all chromosomes, without any preferential association to the male X chromosome. These results suggest that in* Sciara *the gene* mle *plays no role on the dosage compensation process.*

The segmental organisation of the genital disc of D. melanogater *has been analysed. The results show that the three primordia, the female and male genitalia plus the analia, are composed of an anterior and a posterior compartment. The expression of the homeotic genes, abdominal-A and Abdominal-B, suggests a parasegmental organisation of the genital disc, although these genes may also change their expression patterns during larval development. The analyses of the expression pattern of the genes decapentaplegic, wingless, hedgehog and patched demonstrated that the genital disc is organised in a manner similar to the antennal and leg discs: both genes decapentaplegic and wingless act as general organisers for development of the genital disc. It is further proposed that the control of cell proliferation in the male and female genitalia requires the concerted action of Abdominal-B and doublesex, either directly or indirectly, through the expression of the genes decapentaplegic and wingless.*

The analyses of the interspecific hybrids between the species of the Melanogaster *subgroup have demonstrated the existence of different reproductive isolation barriers between these species. It is proposed that these barriers are the result of alterations in the co-adapted gene complexes of these species.*

Using the generalised logical formalism, the establishment of the dorsal-ventral pattern during embryonic development of D. melanogater *has been analysed. Two positive intracellular loops between the regulatory genes were found to be involved, each constituting a switch which can be acted upon by the Dorsal morphogen to determine the different cell types that make up the embryonic dorso-ventral pattern. The novelty in this use of generalised logical formalism is the employment of a multilevel variable to represent a morphogen gradient.*

te el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Dicho patrón está organizado por la acción del morfógeno Dorsal sobre dos "*loops*" positivos formados por genes reguladores que actúan intracelularmente. La novedad de este análisis estriba en el empleo de una variable con múltiple valores para la representación de un gradiente morfogenético.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— DGICYT, PB95-1236 (1996-1999).

— DGICYT, UE95-0035 (1995-1997).

— UE, CII*-CT94-0071 (1995-1997).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Casares, F., Sánchez, L., Guerrero, I., and Sánchez-Herrero, E. (1997). The genital disc of *Drosophila melanogaster*. I. Segmental and compartmental organization. Dev. Genes Evol. 207, 216-228.

— Granadino, B., Penalva, L.O.F., Green, M., Valcárcel, J., and Sánchez, L. (1997). Distinct mechanisms of splicing regulation *in vivo* by the *Drosophila* protein Sex-lethal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 7343-7348.

— Sánchez, L., and Santamaría, P. (1997). Reproductive isolation and morphological evolution in Drosophila analyzed by breakage of ethological barriers. Genetics 147, 231-242.

— Sánchez, L., Casares, F., Gorfinkiel, N., and Guerrero, I. (1997). The genital disc of *Drosophila melanogaster*. II. Role of the genes *hedgehog*, *decapentaplegic* and *wingless*. Dev. Genes Evol. 207, 229-241.

— Sánchez, L., van Helden, J., and Thieffry, D. (1997). Establishment of the dorsal-ventral pattern during embryonic development of *Drosophila melanogaster*: a logical analysis. J. Theor. Biol. 189, 377-389.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Sánchez, L. (1997). Determinación sexual y compensación de dosis génica en *Drosophila*, *Caenorhabditis* y Mamíferos: Aspectos comparativos. En Organización y evolución del genoma eucariota. Marcadores moleculares. III Simposio científico en Biología Celular y Molecular. J. Méndez, E. Cerdán, A. M. Rodríguez y A. Martínez, eds. (Universidade da Coruña, A Coruña, España), pp. 149-173.

— Sánchez, L., López, P.P. and Granadino, B. (1998). Early events associated with sex determination in *Drosophila melanogaster*. In Genome analysis in eukaryotes: developmental and evolutionary aspects, R. N. Chatterjee and L. Sánchez, eds. (Narosha-Springer Verlag, New Delhi, India), pp. 98-119

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*

Kerman Alloria (II, 1998)
Cristina Templado (XI, 1998)
Investigadores Visitantes / *Visiting Scientists*

Luis A. López Fernández (Desde II-1998)
Mario Párraga San Román
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Edmundo Bonilla González
Rafael García Ortega (Desde VIII-1997)
Óscar de Luis Jiménez (Hasta VII-1998)
Juan C. Ortega Lázaro
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Fernando Escolar Antúnez
Olga Millán Tortillo
Personal Técnico / *Technicians*

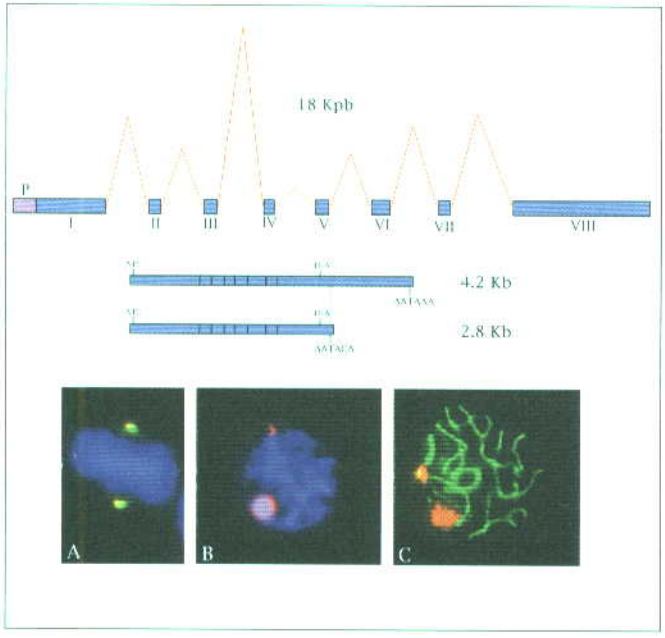


Figura: Esquema de la estructura genomica del gen *XYbp*. El procesamiento de sus ocho exones genera dos transcritos, uno de 4.2 Kb y otro de 2.8 Kb debido a una señal de poliadenilación no canonica (AATACA), expresado especificamente en células germinales de testículo.
El producto génico XYbp se localiza a nivel centrosómico tanto en células somaticas (A, fibroblasto mitótico) como en células germinales en estado de paquitena (B y C). En células paquiténicas, se hace patente su localización a nivel del cuerpo XY (bivalente sexual) tal y como se demuestra con la colocalización de los complejos sinaptonémicos (C). Rojo: localización de la proteina XYbp; azul: tinción nuclear con Hoechst 33258; amarillo: colocalización de XYbp y α-tubulina; verde: localización de SCP3 (proteina del complejo sinaptonémico).

Figure: Genomic structure of the XYbp gene. Exon splicing produces two transcripts, one of 4.2 Kb and a second one of 2.8 Kb, testis-specific, generated by a non-canonical polyadenylation signal (AATACA). XYbp gene product is located on the centrosomal region both in somatic cells (A, mitotic fibroblast) and in pachytene germ cells (B and C). In pachytenes, XYbp is mainly located on the XY body (sexual bivalent) as it is demonstrated in C with the colocalization of synaptonemal complexes.
Red: XYbp signal; blue: Hoechst 33258 nuclear staining; yellow: XYbp and α-tubulin colocalization; green: synaptonemal complex protein (SCP3).

Palabras clave: Gametogénesis, expresión génica, toxicología reproductiva.

La gametogénesis en mamíferos es un proceso genéticamente controlado por medio de cascadas regulatorias de expresión génica. El principal objetivo de nuestro laboratorio es el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación de las células germinales. En estudios previos, hemos aislado y clonado diferentes genes a partir de genotecas de cDNA de ovario fetal de ratón y genotecas de sustracción de testículo prepuberal. Después de la secuenciación, hemos seleccionado alguno de estos genes, tanto correspondientes a genes conocidos como noveles, y analizado su expresión génica durante gametogénesis. Hemos centrado nuestra atención en aquellos que presentaban un patrón de expresión regulado durante el desarrollo conducente a la diferenciación terminal en gametos.

También hemos iniciado un proyecto europeo, cuyo objetivo es el análisis del efecto de agentes reprotóxicos sobre la diferenciación de células germinales. Más específicamente, estamos implicados en el desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* de células germinales y marcadores genéticos para Toxicología Reproductiva.

Así mismo, nuestro grupo proporciona apoyo metodológico y colaboración en el desarrollo de proyectos de control biológico de organismos biodegradantes.

Regulación de la expresión génica durante la gametogénesis

Nuestro laboratorio se ha centrado en el estudio de genes, aislados selectivamente de genotecas de cDNA de tejido gonadal, con el propósito de analizar sus mecanismos reguladores y su función en este proceso de diferenciación celular terminal que concluye en la formación de los gametos.

El papel de la poliadenilación de las regiones 3' UTR en la expresión génica específica durante gametogénesis, ha sido analizada en distintos casos. En la familia isoenzimática de la piruvato quinasa (PK), hemos constatado cómo la expresión

Keywords: Gametogenesis, gene expression, reproductive toxicology.

In mammals, gametogenesis is a process genetically controlled by regulatory cascades. The main focus of research in our laboratory is on the molecular mechanisms governing the differentiation of germ cells. In previous studies, we have isolated and cloned different genes from mouse foetal ovary cDNA and prepuberal testis subtractive libraries. After sequencing, we have selected some of both known and novel genes, and analysed their genetic expression during gametogenesis. We have focused on those which showed a regulated expression pattern during the development, ending in the terminal differentiation of the gamete.

We have also initiated an EU project concerning the analysis of the effect of reprotoxicants onto the germ cells differentiation. More specifically, we are involved in the development of in vitro germ cell culture systems and genetic markers for Reproductive Toxicology.

Our group also offers methodological support and collaboration to the development of projects on biological control of biodegrading organisms.

Regulation of gene expression during gametogenesis

Our laboratory has focused on the study of genes, isolated from cDNA libraries from gonadal tissues. The aim was to analyse the regulatory mechanisms and the role of these genes in the process of terminal cell differentiation ending in the formation of gameta.

The role of the 3' UTR region polyadenylation in the specific genetic expression during gametogenesis has been analysed in different cases. In the pyruvate kinase (PK) isoenzyme family, we have demonstrated that the differential expression of the genes encoding for the M1 and M2 isoenzymes, associated with an increase of the poly [A] tail in the M1 transcripts, is controlled during spermatogenesis. The appearance of genes for the "poly A binding protein" and RNA helicases, in the mentioned libraries, also points out the importance of this post-transcriptional regulatory mechanism on 3' UTR regions.

A cDNA for the variant histone H3.3A, cloned from a foetal ovary library, showed a particular genetic structure which con-

diferencial de los genes para las isoenzimas M1 y M2 está asociada con un incremento de la cola de poliadeninas de los transcritos de M1, regulados durante la espermatogénesis. El aislamiento, a partir de las genotecas reseñadas, de genes para: "polyA *binding protein*" y RNA helicasas indican también la importancia de mecanismos de regulación postranscripcional, afectando a regiones 3' UTR.

Un cDNA para la variante histónica H3.3A, clonado a partir de una genoteca de ovario fetal, nos ha permitido caracterizar en su región 5' UTR una región homóloga a la reversa y complementaria del gen para α-globina. El análisis de su expresión génica revela una regulación durante el desarrollo de la ovogénesis y la espermatogénesis concurrente con el inicio meiótico.

Hemos proseguido el análisis de la familia de genes para fosfatasa PP2A y de su posible función como reguladores del inicio meiótico. Hemos clonado diferentes nuevos genes para las subunidades reguladoras de estas protein-fosfatasas.

Como genes noveles, nos hemos centrado en los denominados: *XYbp*, *Tex-261* y *Tex-27*. *XYbp* expresa dos transcritos: de 4.2Kb a bajo nivel y constitutivamente, y de 2.8Kb, específico de testículo, procesado mediante poliadenilación alternativa a partir de una señal de poliadenilación no canónica. Hemos comprobado que este gen, conservado evolutivamente de levadura al hombre, codifica para una proteína localizada en regiones centrosómicas de cualquier célula y asociado al bivalente XY durante la meiosis. Se ha caracterizado la secuencia y estructura genómica de sus 18Kpb (ver Figura), los 8 exones y su región promotora en la que ademas de TATA box, GC box y AP-1, se localizan múltiples secuencias para elementos de choque térmico (HSEs). Mediante diversos abordajes, tales como: generación de ratones transgénicos con construcciones anti-sense, caracterización de genes homólogos en *Drosophila in vitro*, estamos progresando en el conocimiento de su función y regulación.

Tex-261 presenta un patrón de regulación definido durante la espermatogénesis, no asociado a esteroidogénesis mediante el gen StAR, como habían señalado otros autores. Otros genes de

tains, in the 5' UTR region, an homologous and complementary region from the α-globin gene. The analysis of its genetic expression reveals a regulation during the development of both ovogenesis and spermatogenesis, concurrent with the meiotic onset.

We are progressing in the analysis of the phosphatase PP2A gene family and its possible functional role as a regulator of the meiotic onset. We have cloned different novel genes for the regulatory subunits of these protein phosphatases.

As novel genes, we have focused on XYbp, Tex-261 and Tex-27. XYbp expresses two transcripts: 4.2Kb, constitutively expressed at low level, and 2.8Kb, testis-specific after meiotic onset. We have demonstrated that this gene, highly conserved during evolution from yeast to human, codes for a protein located on the centrosomal regions of any cell but associated to the XY bivalent during meiosis. After sequencing its 18Kbp, the genomic structure has been established (see Figure). It has been characterised 8 exons and the promotor region where a TATA box, CG box and AP-1 have been localised along with multiple sequence for heat shock elements (HSEs). We are progressing on the knowledge of its functional role and regulation by means of different approaches such as: transgenic mice with antisense constructions and characterisation of homologous sequences in Drosophila.

Tex-261 presents a regulatory pattern during spermatogenesis which is not associated to esteroidogenesis (such as StAR genes), as was reported by other authors. Other genes involved in the regulation of germ cells, such as Aldh-1, have been identified as transcripts specifically regulated in Leydig cells. From Tex-27, also cloned in our laboratory, we know that this gene shows a preferential expression in haploid stages. This gene, highly conserved in mammals, encodes for a polypeptide containing domains of DNA binding by a zinc-finger structure. We are currently analysing its role as transcription factor in spermatogenesis. Two genes: Nf45 and Nf90 corresponding to transcription factors are also been analysed. Both factors are associated to germ cell development but also participating in other processes of cell cycle and differentiation.

importante repercusión en la regulación de células germinales, como es el caso de *Aldh-1*, ha sido identificado como transcrito y regulado en células de Leydig. Del gen *Tex-27*, también clonado en nuestro laboratorio, conocemos su expresión preferencial en estadíos haploides, y que presentando un alto grado de conservación en mamíferos, codifica para un polipéptido con dominios de unión a DNA mediante *zinc-finger* ; estamos analizando su papel como factor de transcripción en espermatogénesis. También se están analizando dos genes correspondientes a potenciales factores de transcripción: *Nf45* y *Nf90*; ambos se presentan asociados a desarrollo de células germinales ademas de participar en otros procesos de diferenciación y ciclo celular.

Desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* de células germinales y marcadores genéticos para toxicología reproductiva

Esta línea, basada en proyectos financiados por la Comisión Europea (Biotecnología) y la CAM, pretende desarrollar sistemas integrados de cultivo *in vitro* de células germinales tanto masculinas como femeninas, y generar marcadores genéticos y celulares como efecto de agentes reprotóxicos potenciales.

Los actuales tests *in vivo* para evaluar el riesgo toxicológico de agentes químicos y farmacológicos sobre las células germinales presentan múltiples limitaciones para su valoración. Sin embargo, los posibles efectos adversos de dichos compuestos, tanto sobre las células germinales como sobre los sistemas reproductivos, van más allá de los individuos potencialmente afectados, impactando sobre las generaciones futuras. El principal objetivo del proyecto es el desarrollo de alternativas *in vitro* que empleen células cultivadas de mamífero con el fin de obtener valoraciones más precisas de cada compuesto y sus dosis críticas. Este abordaje reduciría los costes en la industria de la evaluación de tóxicos potenciales. Al mismo tiempo, se reduciría de forma significativa el número de animales que actualmente se emplean en el muestro *in vivo*.

Hasta la fecha, la naturaleza del desarrollo de la célula germinal y de los complejos mecanismos de su regulación ha hecho

Development of in vitro *mammalian germ cell culture systems and genetic markers for reproductive toxicology*

This line, supported by the E. Commission (Biotechnology) and CAM, pretends to develop integrated systems for the in vitro culture of both mouse male and female germ cells, and to generate genetic and cellular markers for potential reprotoxicants.

The current in vivo tests to estimate the toxicological risk of chemical and pharmaceutical agents on germ cells present multiple limitation of assessment. However, the potential adverse effects of such compounds, on germ cell and reproductive systems, go beyond damage to the individuals potentially affected and impact upon future generations. The development of in vitro alternatives using mammalian cultured germ cells is an unique aim that will for the more sensitive assessment of compounds and critical dosages. This approach will reduce the costs in the evaluation of potential toxicants for the industry. It will also greatly reduce the amount of live animals currently used for in vivo testing.

To date, the nature of germ cell development and the complex mechanisms of its regulation had made not possible to have standard in vitro systems for genotoxicity testing. In addition, there is total lack of systematic assessment of the risks upon female germ cells. There are no useful genetics and cellular markers that can be used as specific endpoints for toxicological damage in specific germline.

Our work is concerned with the study of differential gene expression of germ and somatic supporting cells in the gonads, under the effect of selected reprotoxicants. Our goal is to select potential genetic markers for reprotoxicity. To this aim, different approaches have been applied, such as subtractive cDNA libraries using very limited number of germ cells, clone selection by differential screening in cells treated and no treated with toxicants to end in the gene characterisation of the selected genetic markers. Until now, different libraries from cultured foetal oocytes, purified and in vitro cultured Sertoli cells and primordial germ cells (PGCs) selected before sex differen-

imposible disponer de sistemas estandarizados *in vitro* para el análisis de genotoxicidad. Además, se carece de un sistema de valoración sistemática de los riesgos sobre células germinales femeninas. No se dispone de marcadores genéticos ni celulares de utilidad que puedan ser usados como referencias específicas del daño toxicológico en línea germinal específica

Nuestra labor se centra en el estudio de la expresión génica diferencial tanto de las células germinales como de las somáticas encargadas del mantenimiento de las células germinales en las gónadas, en ambos casos bajo los efectos de reprotóxicos seleccionados. Nuestro objetivo es seleccionar posibles marcadores genéticos de reprotoxicidad. Con este propósito se han llevado a cabo diversos abordajes tales como genotecas sustractivas de cDNA a partir de un número muy limitado de células germinales en cultivo, selección de clones por análisis diferencial en células sometidas o no a estres tóxico y caracterización génica y de expresión de tales marcadores. Hasta el momento se han generado diferentes genotecas procedentes de ovocitos fetales en cultivo, células de Sertoli purificadas y cultivadas *in vitro* y células primordiales germinales (PGCs) antes de su diferenciación a línea masculina o femenina. El análisis comparativo de estas células tratadas con gentóxicos potenciales, en relación con su expresión génica de células no tratadas nos ha permitido reconocer una serie de genes implicados en metabolismo celular, ciclo, factores de crecimiento y factores de transcripción que sufren desregulación especifica bajo el efecto de diferentes compuestos tanto medio ambientales como terapéuticos. Están siendo analizados sus mecanismos de acción y el control de su expresión génica en gametogénesis.

tiation, has been generated. As a result of the comparative analysis of gene expression in booth treated and untreated cells, we have identified different genes specifically deregulated under the effect of various environmental and therapeutic compounds. These genes involved in: cell cycle and metabolism, as well as growth and transcription factors, are being analysed to know the mechanisms of action and the regulation of gene expression during gametogenesis.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 07B/0022 (1997-1999).
— CE, Biotechnology PL 960183 (Coordinador: J. del Mazo),(1996-1999)
— CICYT, BIO96-2523-CE (1997).
— DGICYT, PB95-0119 (1996-1999).
— EC, ENV4-CT98-0711 (1998-2000).
— Getty C. Inst. (USA) (1997-1998).

Tesis Doctoral/*Doctoral Thesis*

— **Mario Párraga San Román**. Identificación y análisis de un nuevo gen: *XYbp (XY body protein)*, regulado en la espermatogénesis de ratón.. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Director: J. del Mazo.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— López-Alañón, D.M., López-Fernández, L.A., Castañeda, V., Krimer, D.B., and Del Mazo, J. (1997). H3.3A variant histone mRNA containing an -globin insertion: modulated expression during mouse gametogenesis correlates with meiotic onset. DNA Cel. Biol. *16*, 639-644
— López-Fernández, L.A., and Del Mazo, J. (1997). The cytosolic aldehyde dehydrogenase gene (*Aldh1*) is developmentally expressed in Leydig cells. FEBS Let. *407*, 225-229.
— López-Fernández, L.A., López-Alañón, D.M., Castañeda, V., Krimer, D.B., and Del Mazo, J. (1997). Development expression of H3.3A variant-histone mRNA in mouse. Int. J. Devel. Biol. *41*, 699-703.
— De Luis, O., and del Mazo, J. (1998). Gene expression of mouse M1 and M2 pyruvate kinase isoenzymes during the development of spermatogenesis correlates with differential poly[A] tract extension of its mRNAs. Biochim. Biophys. Acta *1396*, 294-305.
— López-Fernández, L.A., Párraga, M., and Del Mazo, J. (1998). *Tex261*, a novel gene presumably related but distinct from steroidogenic acute regulatory (*StAR*) gene, is regulated during the development of germ cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 242, 565-569

Biología de la Reproducción
Biology of Reproduction

Pedro Esponda Fernández
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Rosa Carballada Díaz (Desde X-1998)
Investigadora Contratada / *Research Associate*

Eduardo Bustos Obregón (IX, 1998)
Rosa Guerra Muñoz (IX-XI, 1998)
Dino di Berardino (IV-1998)
Investigadores Visitantes / *Visiting Scientists*

Eva Huguet Gutiérrez
Miguel Relloso Cereceda
Mario Valenzuela Estrada (Hasta VII-1997)
Verónica Rojas Durán (Desde XI-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Daniel Díaz López
Pregraduado / *Pregraduate Student*

Ascensión González Díaz
Personal Técnico / *Technician*

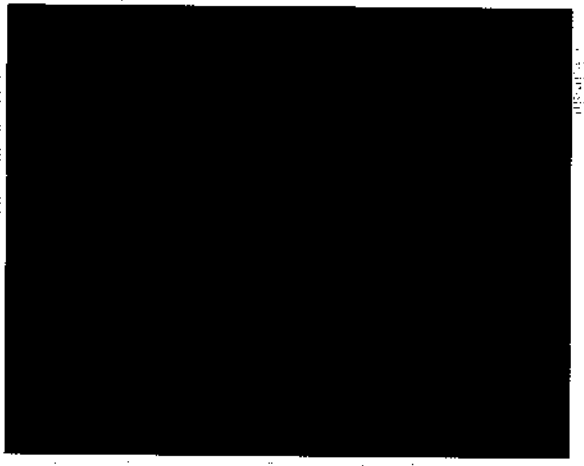


Figura: Espermatozoide de ratón transfectado *in vivo* con el plásmido pGFP. El método de hibridación *in situ* muestra que el transgen se localiza principalmente en la cabeza del gameto. Observación con microscopía confocal.
Figure: Mouse spermatozoa after in vivo *transfection with the pGFP plamid. After* in situ *hybrization the transgen appear mainly in the spermatozoon head. Confocal laser microscopy observation.*

Palabras clave: Espermatozoides, Fecundación, Liposomas, Oviducto, Transferencia de genes.

Keywords: Fertilization, oviduct, gene transfer, liposomes, spermatozoa.

Este grupo se ha dedicado al estudio de algunas características reproductivas de los mamíferos.

This group is devoted to the analysis of two aspects of mammalian reproductive tissues and spermatozoa.

I.- Inducción de alteraciones génicas en los tractos reproductores y en los gametos masculinos. a) Utilizando los plásmidos que codifican para los marcadores pGFP y ß-Gal asociados a liposomas catiónicos se han transfectado *in vivo* tanto el tracto masculino (vaso deferente) como el femenino (útero y oviducto). La transfección afecta al epitelio de todos estos conductos, y su éxito parece depender, en algunos casos, del estado hormonal de las células. b) Utilizando inyecciones de genes en el vaso deferente se han transfectado un alto porcentaje de los espermatozoides contenidos en este conducto. Estos resultados son interesantes en cuanto a posibles aplicaciones en Biotecnología (ani-

I.- Gene modifications induced in reproductive tissues and gametes. a) Reproductive tracts were in vivo transfected using the reporter genes pGFP or ß-Gal complexed to cationic liposomes. The vas deferens, the uterus and the oviduct were transfected. Transfection principally succeed in the epithelial cells and sometimes depend of the hormonal state. b) After the injection of foreign genes into the vas deferens numerous spermatozoa contained in the vas appeared transfected. These results seems interesting considering potential applications for Biotechnology (transgenic animals) or to gene therapies focussed to fertility control in mammals.

males transgénicos), y en relación con terapias génicas enfocadas al control de la fertilidad en los mamíferos.

II.- Por otra parte, se han analizado varios aspectos del transporte espermático en el tracto genital femenino. En concreto, se ha estudiado el papel de las secreciones de las glándulas anexas del aparato reproductor masculino. Los proteínas secretadas por estas glándulas aparecen asociadas al gameto masculino en el útero y guardan relación con el transporte espermático y con la protección de los espermatozoides. Además, se ha realizado un análisis del transporte espermático en el oviducto, comprobándose que las criptas del itsmo oviductal ejercen un control sobre la fertilidad de los espermatozoides allí anidados. Dichos espermatozoides mantienen su acrosoma intacto y serán los que posteriormente fecundarán al oocito. Dado que es el itsmo la región que se transfecta con mayor facilidad, este resultado parece de extrema importancia a la hora de elaborar futuras estrategias de manipulación genética en el oviducto.

II.- The relationship between the secretions of the male accessory glands and sperm transport in the female tract was also analyzed. This secretions binds to the spermatozoa at ejaculation and probably functions as protective factors and/or regulators of sperm transport. Sperm transport was also analyzed in the oviduct. In this organ, the isthmus crypts preserve acrosome integrity of spermatozoa and then collaborate to the fertilizing capacity of gametes. Because the oviductal isthmus is easy to transfect, this result is significant when future strategies of gene manipulation in the oviduct are conceived.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*
— DGYCYT PB93-0117 (1994-1997).
— CAM 095/1996 (1997).
— CAM 07B/0023/1997 (1998-1999).
— DGICYT PB96080 (1997-2000).

Tesis Doctoral/*Doctoral Thesis*
— **Mario Valenzuela Estrada.** Transferencia de genes al tracto reproductor masculino mediante complejos DNA/Liposomas. Universidad Autónoma de Madrid, 1997. Director: Pedro Esponda

Tesinas de Licenciatura/*Master Thesis*
— **Mercedes García Gila.** Análisis comparativo de las proteínas secretadas por la cauda epididimaria de la rata y de la cobaya. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Director: Pedro Esponda.

Patente/*Patent*
— **Pedro Esponda y Eva Huguet.**
Método para crear animales transgénicos mediante la inyección de genes en el vaso deferente.
9801827 (España)

Publicaciones/*Publications*
Artículos en Revistas/*Journal Articles*
— Carballada,R., and Esponda,P. (1997). Fate and distribution of seminal plasma proteins in the genital tract of the female rat after natural mating. J. Reprod. Fertility *109*, 325-335.
— Carballada,R., and Esponda,P. (1998). Binding os seminal vesicle proteins to the plasma membrane of rat spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. Int. J. Androl. *21*.19-28.
— Esponda, P., and Moreno, M.(1998). Acrosomal status of mouse spermatozoa in the oviductal isthmus. J. Exp. Zool. *282*, 360-366.
— Huguet, E., and Esponda, P. (1998). Foreign DNA introduced into the vas deferens is gained by mammalian spermatozoa. Mol. Reprod. Devel. *51*, 42-52.
— Relloso, M., and Esponda, P. (1988). *In vivo* gene transfer to the mouse oviduct epithelium. Fertility & Sterility *70*,336-368.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*
— Esponda,P., and Huguet,E. (1998). Foreign gene injection into the male genital tract induce genetic modifications in spermatozoa. En: Male Reproduction: A multidisciplinary overview, ed. Martínez F., and Regadera. J. (Churchill Comm. Europe) pp. 17-27.

Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados

Growth Factors in Vertebrate Development

Flora de Pablo
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Enrique J. de la Rosa
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Cristina Alarcón (Hasta VII-1998)
José García Pichel
Investigadores Contratados / *Research Associates*

Elena Vega Nuñez
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

Aixa V. Morales García(Hasta IX-1997)
Begoña Díaz
Carmen Fernández Moreno (Desde IX-1997)
Belén Pimentel
Eva Rubio (Desde IX-1997)
José Serna López
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Virginia Quesada Guerrero
Personal Técnico / *Technician*

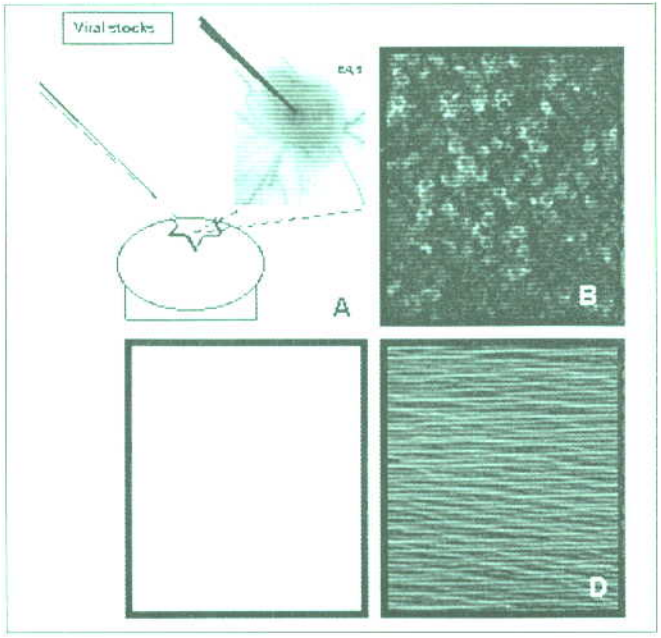


Figura: Modulación de la neurogénesis por c-Raf.
A) Esquema de la inyección intravitreal de la construcción retroviral en el embrión *in ovo*. Las retinas fueron analizadas a las 72 h post-inyección.
B) La infección viral se demuestra por la expresión de proteínas virales en la neuroretina.
C) La expresión de c-Raf mutado, con actividad dominante negativa, disminuyó el número de axones observables por inmunotinción para Ng-CAM/G4, respecto al control (D). B, C y D son cortes ópticos a nivel de la capa de células ganglionares, generados con el microscopio confocal MRC-1024 (BioRad). (Belén Pimentel, Flora de Pablo y Enrique J. de la Rosa, enviado para publicación).

Figure: Modulation of neurogenesis by c-Raf.
A) Scheme of intravitreal injection of the retroviral construction in the embryo in ovo. The retinas were analyzed 72 hours postinjection.
B) The viral infection is demonstrated by the expression of viral proteins in the neuroretina.
C) The expression of mutated c-Raf with dominant negative activity decreased the number of axons revealed by immunostain for Ng-CAM/G4, relative to control (D). B, C and D are optical sections at the level of the ganglion cell layer, generated by a MRC-1024 confocal microscope (BioRad). (Belen Pimentel, Flora de Pablo, and Enrique J. de la Rosa, submitted).

Palabras clave: Desarrollo, apoptosis, proinsulina, neurogénesis, chaperonas.

Regulación y acción de los factores de crecimiento de la familia de la insulina en el desarrollo embrionario temprano

Estudiamos la insulina, su precursor la proinsulina y los factores de crecimiento insulina-*like* (IGF I y II) a niveles molecular, celular y del organismo, utilizando como modelo el embrión de pollo. Los genes de la proinsulina y del IGF-I están expresados de forma alternada durante la neurulación y el comienzo de la organogénesis. Analizamos, especialmente, el papel anti-apoptótico de la (pro)insulina prepancreática. Utilizando cultivos de embrión, hemos demostrado que el mRNA de (pro)insulina se traduce a proinsulina que es secretada sin procesar. La inhibición de su síntesis por oligonucleótidos complementarios al mRNA de proinsulina induce un aumento de muerte celular por apoptosis en el embrión. *In vivo*, con un enfoque similar, hemos demostrado la participación del receptor de insulina en la supervivencia. La utilización de un promotor alternativo en el gen de la proinsulina, para su expresión prepancreática o extrapancreática, no sensible a glucosa, se está estudiando en el embrión en neurulación y en el hígado.

Caracterización en la neurogénesis retiniana de los efectos y vias de activación de factores de crecimiento

En el modelo de retina de embrión de pollo estamos analizando la neurogénesis, proceso en el que a partir de una población de precursores neurales pluripotentes, se generan los diferentes tipos de neuronas y de glía que constituyen el sistema nervioso. Combinando técnicas de marcaje TUNEL para apoptosis, de incorporación de [^{3}H] -Timidina o Bromodeoxiuridina para proliferación, y de tinción para marcadores de diferenciación neural, tras tratamiento con anticuerpos anti-insulina y anti-receptor de insulina *in ovo*, caracterizamos el efecto de la insulina en las distintas fases de la neurogénesis *in vivo*. Los procesos de supervivencia y, secundariamente, proliferación y diferenciación neurales son estimulados por (pro)insulina e IGF-I actuando de manera autocrina/paracrina. Durante la fase proli-

Keywords: Development, apoptosis, proinsulin, neurogenesis, chaperones.

Regulation and action of the growth factors of the insulin family in early embryonic development

We study insulin, its precursor proinsulin and the insulin-like growth factors (IGF-I and II) at molecular, cellular and whole organism levels using the chick embryo as a model. The proinsulin and IGF-I genes are expressed in alternate fashion during neurulation and early organogenesis. We specially analyze the antiapoptotic role of prepancreatic (pro)insulin. Using cultured embryos, we have demonstrated that the proinsulin mRNA is translated to proinsulin which is secreted unprocessed. The inhibition of its synthesis by antisense oligonucleotides against proinsulin mRNA induces an increase in apoptotic cell death in the embryo. In vivo, with a similar approach, we have demonstrated the involvement of the insulin receptor in survival. The use of an alternative promoter in the proinsulin gene for its prepancreatic and extrapancreatic expression is under study in the neurulating embryo and the liver.

Characterization in retinal neurogenesis of the effects and activation pathways of growth factors

In the chick embryo retina model we are analyzing neurogenesis, the biological process that generates, from a population of pluripotent neural precursors, the different neuronal and glial types, constituents of the central nervous system. Combining TUNEL labelling for apoptosis, [^{3}H]-Thymidine or Bromodeoxyuridine incorporation for proliferation, and immunostaining for neural differentiation markers, after treatment with antibodies against insulir or its receptor, we characterize the effect of insulin in different phases of neurogenesis in vivo. The processes of survival and, subsequently, neural proliferation and differentiation are stimulated by (pro)insulin and IGF-I acting in autocrine/paracrine manner. We have identified, during the early proliferative phase, an atypical receptor with high affinity and low discrimination that binds similarly insulin and IGF-I. This receptor decreases in later neural differentiation. Its molecular form corresponds to a hybrid insulin/IGF-I receptor. Recently, by using avian retroviruses, we

ferativa temprana hemos identificado un receptor atípico de alta afinidad y baja discriminación, que reconoce de forma similar la (pro)insulina y el IGF-I. Su presencia disminuye durante la fase de diferenciación neural tardía. Molecularmente se trata de un receptor híbrido de insulina/IGF-I. Recientemente, mediante el uso de retrovirus aviares, hemos demostrado la participación de una molécula de la ruta de señalización, c-Raf, en el proceso de neurogénesis (Figura).

Papel de la Hsc70 en la supervivencia celular y su regulación en el desarrollo temprano

Mediante la obtención de marcadores celulares de precursores neurales comprobamos que las células que expresaban el epítopo PM1 eran una subpoblación muy regulada durante la neurogénesis y por factores de crecimiento. Tras purificación de este antígeno, microsecuenciación y clonaje de su cDNA a partir de un fragmento obtenido por RT-PCR, determinamos que se trataba de la chaperona Hsc70, bien conocida en mamíferos. Hsc70 presentaba una dinámica regulación en el desarrollo temprano y clara dependencia de la proinsulina embrionaria, tal como se demostró mediante el bloqueo con oligonucleótidos antisentido, con un posible papel en la supervivencia y el desarrollo. Se están realizando estudios bioquímicos que sitúen esta molécula en la cascada de señalización de supervivencia/apoptosis y clarifiquen su relación con los eventos del desarrollo.

Redes de citoquinas en el desarrollo y la regeneración neural

Se reconoce progresivamente que los factores de crecimiento actúan en redes cooperativas que permiten el desarrollo normal. Estamos estudiando las posibles interacciones funcionales del IGF-I con la citoquina neuropoiética LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) utilizando modelos de ratón mutante nulo. Hemos hallado disminuida la expresión de IGF-I en el ratón carente de LIF, tras la lesión de nervio periférico. La generación de ratones doble mutantes nulos para IGF-I y LIF está demostrando acciones sinérgicas de estos factores en la supervivencia y la regulación del crecimiento postnatal y una posible coordinación en la respuesta a estrés.

have demonstrated the participation of a molecule of the signaling pathway, c-Raf, in the process of neurogenesis (Figure).

Role of Hsc70 in cell survival and regulation during early development

After obtaining cell markers for neural precursors we observed that the PM1 epitope expressing cells were a regulated subpopulation, both during neurogenesis and by growth factors. We purified and microsequenced this antigen, obtained a RT-PCR fragment and then a complete cDNA and demonstrated that it was the chaperone Hsc70, well known in mammals. Hsc70 presents a dynamic regulation in early development and clear dependence from embryonic proinsulin, as revealed by blockade with antisense oligonucleotides. It has a possible role in cell survival and development. Biochemical studies are in progress to place Hsc70 in the survival/apoptosis signaling cascade and clarify its relation with developmental events.

Cytokine networks during development and neural regeneration

It is progressively recognized that growth factors act in cooperative networks that lead to normal development. We are studying the possible functional interactions between IGF-I with the neuropoietic cytokine LIF (Leukemia Inhibitory Factor) using null mutant mice models. We have found a decrease in the expression of IGF-I in the LIF knockout mice after peripheral nerve lesion. We are beginning to analyze mice double null for IGF-I and LIF and find cooperation in the action of these factors at the levels of survival, postnatal growth and possibly response to stress.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— NATO, CRG 955792 (1996-1997).
— DGICYT, PM 94-0152 (1995-1998).
— CAM, 08.6/0018 (1997-1998).
— DGICYT, PM 96-0003 (1997-2000).
— DGICYT, PM 97-0143 (1998-2001).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Aixa V. Morales García.** La insulina embrionaria: Expresión y efectos en apoptosis y sobre precursores celulares durante el desarrollo temprano. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 1997. Co-directores: Flora de Pablo y Enrique J. de la Rosa.

— **Mario García de Lacoba.** Caracterización de los receptores de insulina e IGF-I en la neurogénesis de la retina de embrión de pollo: Estudios de unión y estructura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, 1997. Co-directores: Flora de Pablo y Cristina Alarcón.

— **José Serna López.** Estudio de la expresión de la proinsulina y los IGFs durante el desarrollo del embrión de pollo: Regulación temporal y tisular diferenciales. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 1998. Co-directores: Flora de Pablo y Enrique J. de la Rosa.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Morales, A.V., Serna, J., Alarcón, C., De la Rosa, E.J., and De Pablo, F. (1997). Role of prepancreatic (pro)insulin and the insulin receptor in prevention of embryonic apoptosis. Endocrinology *138*, 3967-3975.

— Alarcón, C., Serna, J., Pérez-Villamil, B., and De Pablo, F. (1998). Synthesis and differentially regulated processing of proinsulin in developing chick pancreas, liver and neuroretina. FEBS Letters *436*, 361-366.

— De la Rosa, E.J., Díaz, B., and De Pablo, F. (1998). Organoculture of the chick embryonic neuroretina. Curr. Top. Dev. Biol. *36*, 133-144.

— De la Rosa, E.J., Vega-Núñez, E., Morales, A.V., Serna, J., Rubio, E., and De Pablo, F. (1998). Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 9950-9955.

— Frago, L., León, Y., De la Rosa, E.J., Gómez-Muñoz, A., and Varela-Nieto, I. (1998). Nerve Growth Factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. J. Cell Sci. *111*, 549-556.

— Morales, A.V., and De Pablo, F. (1998). Inhibition of gene expression by antisense oligonucleotides in chick embryos *in vitro* and *in vivo*. Curr. Top. Dev. Biol. *36*, 37-49.

— Morales, A.V., Hadjiargyrou, M., Díaz, B., Hernández-Sánchez, C., De Pablo, F., and De la Rosa, E.J. (1998). Heat shock proteins in retinal neurogenesis: identification of the PM1 antigen as the chick Hsc70 and its expression in comparison to that of other chaperones. Eur. J. Neurosci. *10*, 3237-3245.

— Serna, J., Pimentel, B., and De la Rosa, E. (1998). Flow cytometric analysis of whole organs and embryos. Curr. Top. Dev. Biol. *36*, 211-222.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— De Pablo, F., Díaz, B., García-de Lacoba, M., Vega, E., and De la Rosa, E.J. (1998). The early embryonic neuroretina: a CNS site of production and action of (pro)insulin and IGF-I. In: Molecular mechanisms to regulate the activities of Insulin-like Growth Factors. Eds.: K. Takano, N. Hizuka and S-I. Takahashi. (The Netherlands: Elsevier Science B.V.), pp. 155-161.

Artículos de Divulgación/*Press Articles*

— De la Rosa, E.J., and Morales, A.V. (1997). La relevancia fisiológica y patológica de la muerte celular. BMi. V-97,28-29.

Departamento de Biología de Plantas
Department of Plant Biology

Jefe de Departamento *Department Head*	**Pedro Castañera Dom[illegible]**
Profesores de Investigación	**Pedro Cast[illegible]uez** **José Ramó[illegible]** **Dionisio [illegible]**
Investigadores Científicos	**Mª [illegible] Gómez** **Mª [illegible]sueño [illegible]**
Científicos Titulares	**Isabel García Luque** **Fco. Javier Medina Díaz** **[illegible] Moreno Díaz de la Espina** **[illegible] Robles Chil[illegible]** **[illegible] Alonso** **[illegible] Testillano** (Desde X-1998) **Mª [illegible] Yoldi**
Personal Técnico	**Carlos Almarza Sanz** **Mercedes [illegible] Romero** **[illegible] Castillo Lluva** (Desde XII-1998) **Diego Díaz Izquierdo** (Hasta XII-1998) **Nieves Fontúrbel Cabañas** **Emiliana Liébana Allende** (Hasta III-1998) **Monserrat Llorente de Mingo** **Mª Luisa Ruiz Serra**
Secretaria	**Mª Victoria Lafita Togor[illegible]**

Matriz Nuclear y Regulación de la Organización y Función del Núcleo
Nuclear Matrix and Regulation of the Nuclear Organization and Function

Susana Moreno Díaz de la Espina
Jefe de Grupo / *Group Leader:*
María Encarnación Fernández Gómez
Investigadoras de Carrera / *Staff Scientists*
Olga Echeverría (VI-1998)
Susana Franca (X-1998)
Investigadoras Visitantes / *Visiting Scientists*
Adriana Arriaga (1998)
Wendou Yu.
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*
Ricardo Acevedo Rojas
Fernando Novillo Zaragoza
Mª del Mar Robles Fernández
Rafael Samaniego García
B. Predoctorales / *Graduate Students*
Mercedes Carnota Romero
Nieves Fontúrbel Cabañas
Personal Técnico / *Technicians*

Microarquitectura del nucleoesqueleto y actividades asociadas

La matriz nuclear (MN) es un concepto operativo que define al conjunto de las fibras altamente insolubles del nucleoesqueleto (un complejo macromolecular cuyos componentes principales son proteínas y DNA) y los complejos

The microarchitecture of the nucleoskeleton and attached activities

The nuclear matrix (NM) defines the highly insoluble fibres of the nucleoskeleton, a macromolecular complex of DNA and proteins, and the attached multimeric complexes, providing physical support for the anchorage of the structural and functional

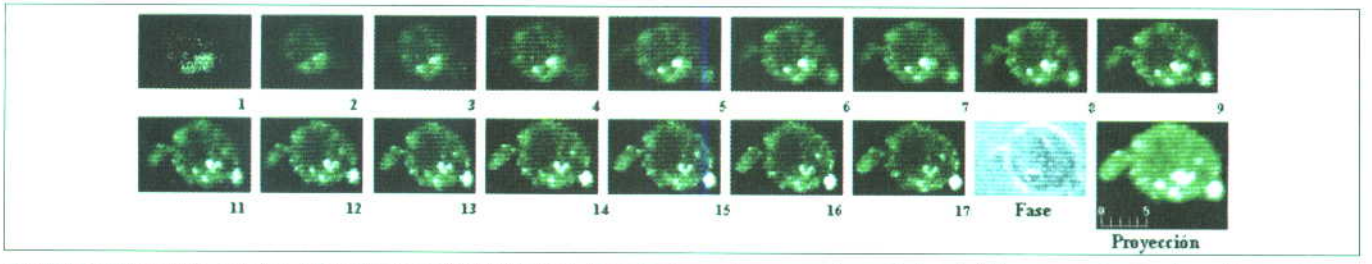


Figura: Distribución topológica de una proteína "*MAR-binding*" de la matriz nuclear en núcleos aislados de *Allium cepa*, visualizada mediante microscopía confocal. 1 a 17: secciones ópticas del núcleo obtenidas cada 0,5 µm, acompañadas de su proyección y la de las correspondientes imágenes de contraste de fase.

Figure: Topological distribution of a MAR-binding protein of the nuclear matrix in isolated nuclei of Allium cepa, *visualized by confocal microscopy. 1 to 17: optical sections of the nucleus taken every 0,5 µm, with their corresponding projection and that of the phase contrast images.*

multiméricos asociados a él, proporcionando el soporte físico para el anclaje de los dominios estructurales y funcionales de la cromatina, y los complejos de replicación, transcripción y procesamiento del RNA. La MN de células vegetales presenta una mayor estabilidad que la de células animales; su resistencia a la extracción con RNasa, alta fuerza iónica en condiciones reductoras, bajas concentraciones de urea, y LIS, sugieren una organización diferente de su nucleoesqueleto. La matriz interna de plantas presenta una organización estructural muy constante en MET, con dos dominios bien definidos: una red fibrilar de 10 nm que contiene antígenos de tipo filamentos intermedios (FI), y otro fibrilogranular que contiene epitopos de los snRNPs y los gránulos intercromatínicos. La ME de cortes sin resina ha revelado una red ramificada de filamentos con estructura periódica, que forman el nucleoesqueleto básico, conectada con la lámina y con agregados densos de tamaño variable. Los resultados de inmunomarcado demuestran que algunos componentes de esta red son proteínas del tipo FI. Actualmente estamos trabajando en la investigación de la composición proteínica y organización estructural de dos de sus dominios: el nucleoesqueleto interno y la matriz nucleolar.

I. Caracterización del nucleoesqueleto básico de plantas

Palabras clave: Matriz nuclear, nucleoesqueleto, filamentos básicos, NuMA, MFP1, huso mitótico.

Nuestro grupo ha conseguido un avance sustancial en la identificación de las proteínas de la MN de plantas, demostrando que existe una conservación evolutiva de sus principales componentes. Tras la identificación de laminas A y B por primera vez en estos sistemas, estamos trabajando en la caracterización de otras proteínas de tipo FI del nucleoesqueleto, entre ellas NuMA, una proteína de 200-240 kD, que juega un importante papel en la organización del núcleo, asociación de los complejos de *splicing* al nucleoesqueleto y en la estabilización del huso mitótico. Identificada previamente sólo en células animales, existen cuatro isoformas producidas por *splicing* alternativo, que varían principal-

domains of chromatin, and also for the replication, transcription and splicing complexes. The NMs of plants show a higher stability than in animal cells. Neither RNase digestion combined with high salt extraction and reducing conditions, nor 4M urea or LIS extraction solubilize the internal elements of the matrices, suggesting a different organization of the Plant nucleoskeleton. The internal matrices of plants present a very constant organization with two structural domains well-defined at the TEM: a network of 10 nm filaments containing antigens related to intermediate filaments (IF) and another fibrogranular with epitopes of snRNP complexes and interchromatin granules. Resinless sections of Plant matrices, have revealed a branched network of knobbed core filaments connected to the lamina which form the nucleoskeleton and show attached dense aggregates of variable sizes. Immunolabelling reveals that IF proteins are components of this network. Our current interest focuses on the investigation of the protein composition and ultrastructural organization of two domains of the NM: the nucleoskeleton and the nucleolar matrix.

I. Characterization of the core nucleoskeleton in plants

Keywords: Nuclear matrix, nucleoskeleton, core filaments, NuMA, MFP1 mitotic spindle.

Our group has contributed a substantial progress to the identification of the proteins of the NM of plants, demonstrating an evolutionary conservation of their main components in eukaryotes. Following the characterization of A and B type lamins for the first time in Plant systems, at the present we are working in other IF-type proteins of the nucleoskeleton such as NuMA, a protein of 200-240 kD, with basic roles in nuclear organization, association of splicing complexes to the nucleoskeleton, and mitotic spindle stabilization. Identified only in animal cells, it presents four different isoforms generated by alternative splicing, which vary in specific domains of the carboxylic end of the protein, which is essential for nuclear import and spindle association. We have identified the homologues of NuMA in onion, with three isoforms of 210, 220 and 230 kD, using antibodies against the X-NuMA. The proteins are localized in the core filaments and the matrix of the mitotic spindle. Our current interest focusses in the purification and sequencing of the onion NuMA isoform of 220 kD, which is the

mente en dominios específicos del extremo carboxílico, esencial para su transporte al núcleo y asociación al huso mitótico. Con anticuerpos contra diferentes dominios de la X-NuMA, recientemente hemos identificado y localizado *in situ* el homólogo de NuMA en plantas con tres isoformas de 210, 220 y 230 kD, con diferente solubilidad, localizadas en los filamentos del nucleoesqueleto en interfase y la matriz del huso mitótico. Actualmente estamos trabajando en la purificación y secuenciación de la isoforma de 220 kD que es la más abundante, y se encuentra en forma insoluble en el nucleoesqueleto. Después de la identificación de laminas A y B, y NuMA estamos iniciando la identificación y caracterización de otras proteínas de tipo FI de plantas, entre ellas MFP1 y p55.

II. Caracterización de las MARs de los genes ribosómicos y de las proteínas de anclaje a la matriz nucleolar

Palabras clave: MARs, rDNA, matriz nuclear, proteínas *MAR-binding*, MFP1.

Las MARs son secuencias específicas de DNA, altamente conservadas, responsables del anclaje de los dominios de cromatina a la MN. La unión de las MARs a la MN se realiza a través de proteínas *MAR-binding*. La información sobre secuencias MAR de genes ribosómicos es muy escasa. Los estudios, todos en células animales, las han localizado en los espaciadores intergénicos no transcritos (NTS) o en el espaciador transcrito externo (ETS), pero no se conocen ni las secuencias ni las proteínas de la MN implicadas en el anclaje. Aunque no existen estudios sobre las MARs de genes ribosómicos de plantas, se han localizado en el NTS de guisante secuencias homólogas a las ARS de levaduras, que son zonas de asociación a MN, y próximas a ella los orígenes de replicación (ori) que son regiones MAR estables. Hemos detectado en la matriz nucleolar de *A. cepa* dos proteínas insolubles con actividad *MAR-binding*: nucleolina y topoisomerasa II.

Estamos trabajando actualmente en la clonación de los genes ribosómicos de *A. cepa* para subclonar e identificar las secuencias MAR endógenas en las fracciones de MNos, mapear su posición en el IGS, estudiar la afinidad y especificidad

most abundant in the insoluble nucleoskeleton. We are also characterising other plant nuclear Ifs such as MFP1 and p55.

II. Characterization of the MARs of the ribosomal genes and the MAR-binding proteins in the nucleolar matrix

Keywords: MARs, ribosomal genes, nuclear matrix, MAR-binding proteins.

The MARs are highly conserved specific DNA sequences, responsible of anchoring chromatin domains to the nuclear matrix. The binding of the MARs to the matrix is reversible and occurs by means of the "MAR-binding" proteins. The information about MAR sequences of ribosomal genes is scarce. The few studies performed, all in animal cells, have localized them in the intergenic spacers (NTS) or the ETS, but the DNA sequences or proteins involved in the anchoring process are still unknown although it has been demonstrated that nucleolin has a MAR-binding activity. Although there are no studies on the MARs of Plant rDNA genes, sequences homologous to the ARS of yeast which are zones of association to the nuclear matrix have been localized in the NTS of Pisum, *and near them the replication origins that are stable MAR region. Besides we have detected an insoluble fraction of nucleolin in the nucleolar matrix of* Allium cepa *and have preliminary evidence of the presence of TOPII, both proteins presenting a MAR binding activity.*

We are now cloning the ribosomal genes of A. cepa *in order to subclone their MARs, map their position in the IGS, identify the endogenous MAR sequences in the nuclear matrices, and analyze the affinity and specificity of their association to the matrix by* in vitro *association assays; and also identify the proteins of the matrix with MAR-binding activity by western blotting. On this line we are analysing different matrix proteins with MAR-binding activity.*

III. Nuclear organization in Dinoflagellates

Keywords: Dinoflagellates, splicing factories, nucleoskeleton.

Dinoflagellates are the only eukariotic phylum which lacks histones and nucleosomes. They have some prokaryotic featu-

de su asociación con las matrices mediante ensayos *in situ*, e identificar las proteínas de la MNo con capacidad *MAR-binding* mediante ensayos con las sondas en *blots* de proteínas transferidas, e identificación de las proteínas en *western blots*. Dentro de esta línea estamos caracterizando proteínas de la matriz con capacidad *MAR-binding*.

III. Organización nuclear en Dinoflagelados

Palabras clave: Dinoflagelados, factorías de *splicing*, nucleoesqueleto.

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, con ligeras variantes que corresponden a las peculiaridades de organización del núcleo en este *phylum*. 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 *loops* 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

res, 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 of 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 Dinoflagellates biology, which maintain 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 and old adquisition of the eukaryotic nucleus, and reinforce the eukaryotic position of Dinoflagellates.

The immunological analysis of the nuclei from several Dinoflagellates species with distant taxonomic positions, suggest that their nucleoplasm is typical of eukariotes, 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 Protist phyla, which do not present a conserved pattern of nuclear organization.

The present objetive of this line is the characterization of the transcription and splicing factories of Dinoflagellates and their relations with the nucleoskeleton. We use an approach of double labeling of the complexes with antibodies against proteins (Sm and SnRNPs) or RNA (3mGcap) specific of them, and hybridization with antisense probes for the RNAs (URNAs, poly A). The

pericromosómica donde se produce la transcripción y se acumulan las ribonucleoproteínas y una región intercromosómica rica en proteínas altamente fosforiladas. 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 pattern conservado de organización nuclear.

El objetivo presente de esta línea es la caracterización de los complejos implicados en transcripción y *splicing* en Dinoflagelados y su relación con el nucleoesqueleto. Para ello estamos utilizando un abordaje experimental de doble marcado de estos complejos con anticuerpos contra proteínas específicas (Sm y SnRNPs) o secuencias del RNA (3mGcap) e hibridación con sondas moleculares "antisense" de sus RNAs (URNAs, poly A). La organización de los complejos y su distribución topológica en el núcleo y nucleoesqueleto se efectúa mediante microscopía confocal y de cortes sin resina.

organization of the complexes and their distribution in the nucleus and nucleoskeleton will be analyzed by confocal microscopy and resinless sections.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CSIC/ICCTIT, (1998-1999).
— CSIC/UNAM, (1998-1999).
— DGES, PB50117 (1996-1999).
— DGES, PB96-0909 (1998-2000).
— M° Asuntos Exteriores, 96CN0014 (1996-1999).

Publicaciones/*Publications*

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

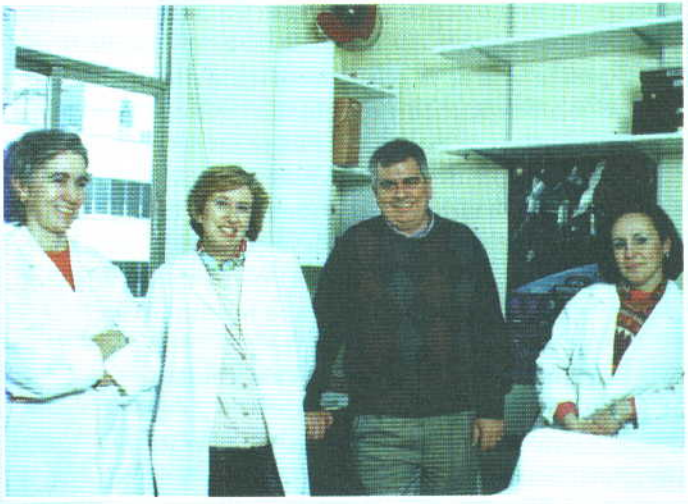
— Acevedo, R., Fernández-Gómez, M.E., De la Torre, C., and Moreno Díaz de la Espina, S. (1998). Analysis of the nucleus in the development of roots in *Saccharum* sp (sugarcane). In Electron Microscopy, Calderón Benavides H.A., and Yacamán, M.J., eds. (London Institute of Physics Publishing), vol. 4, pp. 779-780.
— Yu, W., and Moreno Díaz de la Espina, S. (1998). Organization and composition of the plant nucleoskeleton and nuclear matrix. In Electron Microscopy,. Calderón Benavides H.A., and Yacamán, M.J., eds. (London Institute of Physics Publishing), vol. 4, pp. 777-778.

Nucleolo de Células Vegetales
Plant Cell Nucleolus

Francisco Javier Medina Díaz
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Guillermo de Cárcer Díez (Hasta I-1998)
Francisca Lería Mosquera
Becarios Predoctorales / *Graduate Students*

Mercedes Carnota Romero
Nieves Fontúrbel Cabañas
Personal Técnico / *Technicians*



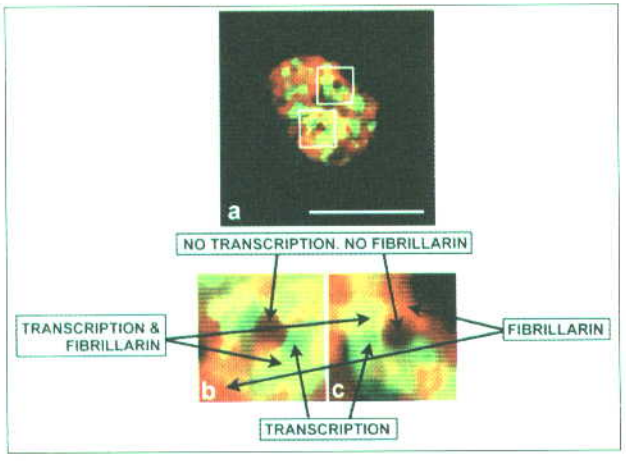


Figura: Localización simultánea *in situ* de la transcripción y del procesamiento temprano del pre-rRNA en el nucleolo, observada al microscopio confocal, sobre núcleos aislados de células meristemáticas de cebolla. La transcripción se detecto tras incorporación de BrUTP, y el procesamiento temprano, mediante la detección inmunocitoquímica de la proteína nucleolar fibrilarina, sobre los mismos núcleos. Clave de colores: Verde: Transcripción. Rojo: Procesamiento temprano. Amarillo: Colocalización de los dos procesos. **a**: Corte óptico obtenido con el microscopio confocal, mostrando la distribución en el nucleolo de los dos marcadores. La barra indica 5 µm. **b** y **c**: Observación a mayor aumento de las zonas limitadas con un cuadrado en **a**.

Figure: Simultaneous localization in situ of pre-rRNA transcription and early processing in the nucleolus, observed under the confocal microscope, on isolated onion meristematic cell nuclei. Transcription was detected after BrUTP incorporation, whereas for early processing, the immunocytochemical detection of the nucleolar protein fibrillarin was used on the same nuclei. Color key: Green: Transcription. Red: Early processing. Yellow: Co-localization of the two processes. **a**: *Confocal optical section, showing the nucleolar distribution of the two markers. Bar indicates 5 µm.* **b** *and* **c**: *Higher magnification of the areas outlined with a square in* **a**.
De Cárcer and Medina, (en prensa,1999)

El nucleolo es la estructura del núcleo de la célula que expresa morfológicamente el proceso de la biogénesis de los ribosomas. La función de los ribosomas en la traducción de la información genética a proteínas hace que la regulación de su biosíntesis sea esencial para la vida de la célula, modulando decisivamente la proliferación, diferenciación y crecimiento celular. Múltiples factores regulan la tasa de expresión de los genes del precursor del RNA ribosómico (pre-rRNA) y la coordinación de los sucesivos pasos de su procesamiento y del ensamblaje de los rRNAs con proteínas. La identificación de estos factores y el conocimiento de sus mecanismos de actuación en el nucleolo de células vegetales es el objetivo global de la investigación de nuestro Grupo.

Proteínas nucleolares y proliferación celular

Palabras clave: Nucleolo, proteínas, proliferación celular, ciclo celular, mitosis.

Los más importantes factores reguladores de la biogénesis de los ribosomas son proteínas nucleolares no ribosómicas, cuya actividad está controlada, a su vez, por mecanismos reguladores del ciclo y la proliferación celular. Hemos identificado y caracterizado dos fosfoproteínas nucleolares mayoritariamente expresadas en células proliferantes de cebolla, denominadas NopA64 y NopA100. Ambas proteínas presentan una forma soluble, mayoritaria, y una forma insoluble, constituyente de la matriz nuclear, y muestran alta conservación evolutiva, que comparten con la nucleolina de mamíferos. Su fosforilación por cdc2 quinasa y caseína quinasa II las vincula con la regulación de la proliferación y el ciclo celular; en concreto, NopA100 es la proteína nuclear más fosforilada de células proliferantes y es además diana de la tinción con plata del organizador nucleolar (AgNOR), una técnica marcadora de proliferación. Además, la expresión de NopA64 y NopA100 es dependiente de la fase del ciclo celular, con expresión basal al comienzo de la interfase, que se incrementa con máxima intensidad antes de la replicación del DNA y alcanza los máximos niveles de acumulación nucleolar en G2. Durante la mitosis ambas proteínas siguen el ciclo del complejo ribonucleoproteico de procesamiento nucleolar, y participan en la nucleologénesis. NopA100 forma parte también

The nucleolus is the nuclear cell structure that morphologically expresses the process of ribosome biogenesis. Since the function of ribosomes is translating genetic information to proteins, regulation of their biosynthesis becomes essential for the cell life. Various factors co-operate in regulating the expression rate of ribosomal RNA precursor (pre-rRNA) genes, in co-ordinating the successive processing steps, and in assembling rRNAs with proteins. Identifying these factors and knowing their functioning mechanisms in the plant cell nucleolus is the major research goal of our Group.

Nucleolar proteins and cell proliferation

Keywords: Nucleolus, proteins, cell proliferation, cell cycle, mitosis

The most important factors regulating ribosome biogenesis are nonribosomal nucleolar proteins, whose activity is, in turn, controlled by mechanisms regulating cell cycle and proliferation. We have identified and characterized two nucleolar phosphoproteins, that we have called NopA64 and NopA100, which are mostly expressed in onion proliferating cells. They show a major soluble form, and an insoluble form which is a component of the nuclear matrix, and they are highly conserved throughout evolution, exhibiting homologies with mammalian nucleolin. Their phosphorylation by cdc2 kinase and casein kinase II connects them with the regulation of cell cycle and proliferation; in particular, NopA100 is the most phosphorylated nuclear protein from proliferating cells, and also it is the target of the silver staining technique for the nucleolar organizer (AgNOR), a known marker of cell proliferation. Moreover, the level of NopA64 and NopA100 expression is dependent on the cell cycle phase, showing basal expression at the beginning of interphase, and progressively increasing up to reaching a maximum intensity before DNA replication, and a maximum level of nucleolar accumulation in G2. During mitosis, both proteins follow the cycle of the nucleolar ribonucleoprotein processing complex, participating in nucleologenesis. NopA100 takes also part in the transcription complex, since it is localized in the chromosomal nucleolar organizer. During interphase, their in situ *localization is restricted to the nucleolus; in proliferating cells the localization follows a vectorial pattern from inside outwards, whereas in quiescent cells they*

del complejo de transcripción, puesto que se localiza en el organizador nucleolar de los cromosomas. En interfase, su distribución *in situ* está restringida al nucleolo; en células proliferantes es vectorial, de dentro afuera, y en células quiescentes, homogénea. Las zonas de localización mayoritaria de NopA64 y NopA100 corresponden a zonas de transcripción y procesamiento temprano del pre-rRNA, como mostraron los ensayos de transcripción *in vitro in situ*, combinados con la detección *in situ* de la primera etapa del procesamiento (ver Figura). Estos experimentos, además, evidenciaron que la transcripción del rDNA ocurre en "focos" discretos, localizados en el componente fibrilar denso del nucleolo, en torno a los centros fibrilares pero sin abarcar toda la periferia de éstos. Por tanto, el componente fibrilar denso, que es estructuralmente homogéneo, presenta diferenciación funcional, tanto radial como lateral.

Nuestros proyectos más inmediatos consisten en aplicar nuestros recursos y conocimientos sobre proteínas nucleolares a la resolución del problema de la expresión diferencial de genes ribosómicos de diferente longitud. La existencia de Variantes de Longitud de Espaciador Intergénico en el rDNA es la causa de la heterogeneidad somática, una característica de muchas plantas que afecta a su desarrollo y tiene importante repercusión en el rendimiento agrícola de las especies vegetales implicadas. En colaboración con el Departamento de Botánica de la Universidad de Pisa (Italia), estudiaremos la maquinaria celular responsable de la expresión diferencial de genes ribosómicos de longitud de espaciador variable, investigando el papel desempeñado por las proteínas nucleolares en este proceso.

El funcionamiento del nucleolo en el espacio bajo microgravedad

Palabras clave: Nucleolo, Biología espacial, microgravedad, preservación, microondas.

Esta línea de investigación se integra en el gran objetivo de conocer las adaptaciones a largo plazo de los seres vivos a otros ambientes extraños, muy diferentes de los que han existido en el Planeta donde estos sistemas han evolucionado. La

distribute homogeneously in the whole nucleolus. The areas of major NopA64 and NopA100 accumulation correspond to zones of pre-rRNA transcription and early processing, as demonstrated by in vitro in situ *transcription experiments combined with* in situ *detection of the first processing step (see Figure). Furthermore, these experiments showed evidence that rDNA transcription occurs in discrete foci, located in the nucleolar dense fibrillar component around fibrillar centers, but not completely surrounding the whole periphery of these structures. Therefore, the structurally homogeneous dense fibrillar component shows a radial and lateral functional differentiation.*

Our most immediate projects will consist of using our resources and knowledge on nucleolar proteins to solve the problem of the differential expression of ribosomal genes having different length. The existence of Intergenic Spacer Length Variants in rDNA is the cause of somatic heterogeneity, a feature of many plants affecting their development, with important consequences on the crop yield of the involved plant species. In association with the Department of Botany from the University of Pisa (Italy), we will study the cell machinery engaged in the differential expression of ribosomal genes of different spacer length, by investigating the role played by nucleolar proteins in this process.

The activity of the nucleolus in space, under microgravity

Keywords: Nucleolus, Space Biology, microgravity, preservation, microwaves.

This research line is integrated in the major goal of getting knowledge on the long-term adaptation of living systems to alien environments, very different from the ones that exist and may have existed in the Planet where these systems have evolved. At the present time, Space research is in a decisive phase, with the start of the operation of the International Space Station, a joint venture of the American, European, Japanese, Russian, and Canadian Agencies, whose assembly has been recently initiated. Our contribution consists of the preparation and execution of experiments to be integrated in this next phase of Space exploration, in particular the study of how microgravity affects the behaviour of nucleolar proteins related to cell proliferation during the

investigación espacial se encuentra en estos momentos en una fase decisiva, con la puesta en funcionamiento de la Estación Espacial Internacional, una iniciativa conjunta de las agencias norteamericana, europea, japonesa, rusa y canadiense, cuyo ensamblaje acaba de iniciarse. Nuestra aportación plantea la preparación y ejecución de experimentos a integrar en esta fase próxima de la exploración espacial, concretamente el estudio de la influencia de la microgravedad en la evolución de proteínas nucleolares relacionadas con la proliferación celular durante el ciclo de división celular de plantas (interfase y mitosis). El trabajo se realiza en colaboración con el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid, y está coordinado, en el marco de la Agencia Espacial Europea (ESA), con otros tres grupos europeos del Reino Unido, Suiza y Francia, en un proyecto conjunto en el que se pretende cubrir una amplia gama de sistemas biológicos y de procesos celulares y de desarrollo fundamentales.

Hasta el momento, las investigaciones realizadas han llevado a la puesta a punto de métodos, nuevos o modificados, para la fijación y preservación de muestras biológicas en experimentos de Biología Espacial. Se ha tratado de superar las limitaciones existentes en las técnicas actualmente disponibles para cumplir con las estrictas restricciones impuestas para la experimentación en la nueva Estación Espacial Internacional y permitir los largos periodos de almacenamiento que serán necesarios para las muestras biológicas a bordo de ella. Los resultados obtenidos se refieren a la fijación estimulada por microondas y al almacenamiento de las muestras en condiciones de subenfriamiento (*subcooling*). Respecto de la fijación, se ha utilizado un horno de microondas termostatizado y, por otra parte, un sistema de "guías" para la irradiación directa y continua de las muestras a potencias muy bajas. En todos los casos se utilizaron protocolos de fijación en paraformaldehído, reduciendo drásticamente el tiempo de fijación y la concentración del fijador respecto de los métodos convencionales. Ambos métodos produjeron una mejora de los resultados obtenidos tras la fijación convencional, utilizando parámetros cuantitativos para medir la calidad de la fijación y los resultados de las pruebas inmunocitoquímicas. Respecto del problema del almacenamiento, se ha investigado

plant cell division cycle (interphase and mitosis). The work will be done in association with the Department of Biochemistry of the Universidad Autónoma de Madrid, and it will be co-ordinated, in the frame of the European Space Agency (ESA), with three additional European research groups (one British, one French, and one Swiss) in a joint project covering a wide range of biological systems and fundamental cellular and developmental processes.

Up till now, our research has led us to design and prepare new or modified procedures for fixation and preservation of biological samples in Space Biology experiments. Our challenge has been to overcome the existing limitations in the currently available ground-based procedures in order to comply with the strict constraints imposed for experimentation in the new International Space Station, and also to allow a long storage of biological samples, which will be necessary on board. The results obtained concern the microwave-enhanced fixation and subcooling, taken as a method for sample storage. Regarding fixation, we have used either a thermostatized microwave oven, or a system of "guides", for direct and continuous sample irradiation at very low power. In both cases, paraformaldehyde fixation procedures were used, with a dramatic reduction of fixation time and fixative concentration. Both methods resulted in an improvement of the structural and antigenic preservation, using quantitative parameters to evaluate the quality of fixation and the results of immunocytochemical tests. Regarding the problem of storage, we have investigated subcooling of cellular and subcellular (isolated nuclei) material, fixed or non-fixed, using the structural and antigenic preservation, at both light and electron microscopy levels, as criteria for validation of the procedure. Our results allow us to recommend this method for storage of hydrated unicellular and/or subcellular biological materials.

el *subcooling* de material celular y subcelular (núcleos aislados), fijado y no fijado, utilizando la preservación estructural y antigénica, a nivel de microscopía óptica y electrónica, como criterio para la validación de la técnica. Los resultados obtenidos permiten recomendar este método para el almacenamiento de materiales biológicos unicelulares y/o subcelulares en estado hidratado.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*
— CICYT, (PNIE), ESP97-1775 (1997-1999).
— DGES, (PGC), PB95-0117 (1996-1999).
— European Space Agency, AO/1-3179/97/NL/MV (1997-1998).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*
— **Guillermo de Cárcer Díez**. Proteínas Nucleolares y Proliferación Celular en *Allium cepa*. Universidad Autónoma de Madrid, 1997. Director: F. J. Medina Díaz.

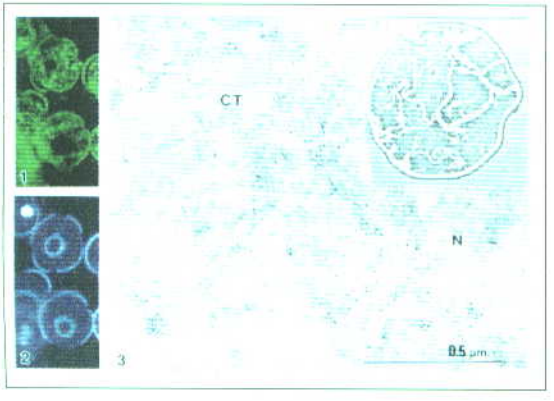
Publicaciones/*Publications*
Artículos en Revistas/*Journal Articles*
— De Cárcer, G., Cerdido, A., and Medina, F.J. (1997). NopA64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin. Planta *201*, 487-495.

Organización Nuclear Durante el Desarrollo de Plantas
Nuclear Organization During Plant Development

María-Carmen Risueño Almeida
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Pilar Sánchez Testillano (Desde X-1998)
Investigadoras de Carrera / *Staff Scientists*
Guillermo Jiménez Durán (Desde III-1997)
Investigador Contratado / *Research Associate*
Guadalupe Préstamo Martínez (1997-1998)
Begoña Fadón Salazar (1997-1998)
Investigadoras Visitantes / *Visiting Scientists*
Pablo González-Melendi de León (Hasta XI-1997)
Jezabel Domenech Manteca (Desde I-1997)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*
Mª José Coronado Albí (Desde X-1997)
José Mª Seguí Simarro (Desde I-1997)
B. Predoctorales / *Graduate Students*
Federico Sepúlveda González
Pregraduado / *Undergraduate student*
Carlos Almarza Sanz
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Polen, embriogénesis de polen, núcleo celular, cromatina, nucleolo, inmunocitoquímica, hibridación *in situ*, criométodos.

Keywords: Pollen, pollen embryogenesis, cell nucleus, chromatin, nucleolus, immunocytochemistry, in situ *hybridization, cryomethods.*



Figuras 1 y 2: Traslocación al núcleo de una MAP quinasa durante el desarrollo *in vitro* del polen. Inmunofluorescencia con anti-Ntf4-MAPK (Fig. 1) y DAPI (Fig. 2) en polen de tabaco; imágenes captadas por cámara CCD.

Figura 3: Expresión *in situ* de un gen específico de embriogénesis en un embrión haploide derivado de polen de maíz (*insert*) mediante hibridación *in situ* en microscopía electrónica de transmisión.

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

La embriogénesis de microsporas y granos de polen *in vitro*, mediante la aplicación de tratamientos de estrés, es hoy en día uno de los métodos más empleados para regeneración de plantas doble-haploides, útiles en la obtención de líneas isogénicas y nuevas variedades en mejora vegetal y biotecnología. La microspora cultivada *in vitro*, tras un 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, y 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 translocaciones 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, e) La presencia, distribución subcelular, expresión *in situ* y translocación de elementos relacionados con la respuesta a estrés y transducción de señales, como las proteínas de choque térmico (HSPs) y las MAP quinasas. Hemos realizado los primeros trabajos de localización a nivel ultraestructural de MAPKs y elementos de sus cascadas en células vegetales quiescentes y en ciclo, así como en el grano de polen durante su desarrollo gametofítico y embriogénesis *in vitro*; estas proteínas juegan un papel en estos procesos que se refleja en cambios en su expresión y localización durante los mismos.

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

Nowadays, microspore embryogenesis and pollen embryogenesis in vitro, *induced by stress treatments, is important in plant breeding and biotechnology. This is one of the most useful methods to regenerate double-haploid plants for obtaining isogenic lines and new varieties. 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 isolated and identified in different species very recently. d) Cell cycle progression in both developmental programs, by studying the dynamics of cell cycle periods and the presence and distribution of regulatory elements. e) Presence, subcellular distribution,* in situ *expression and translocation of elements involved in stress response and signal transduction like heat-shock proteins (HSPs) and MAP kinases. We have performed the first work on the* in situ *localization of MAPKs and pathway elements, at ultrastructural level, in quiescent and proliferating plant cells, as well as in the pollen grain during gametophytic development and embryogenesis* in vitro. *These proteins play a role in both developmental processes which reflects changes in their expression and also their localization during the progress.*

Organización funcional del núcleo en relación a programas de desarrollo y progresión del ciclo celular en plantas

Estudiamos la dinámica de los dominios funcionales y estructurales del núcleo en células vegetales (cromatina condensada, región intercromatínica y nucleolo) en relación a las funciones de replicación, transcripción, procesamiento y transporte de RNAs, Su organización estructural varía en relación a esta actividad y en las diferentes etapas del desarrollo gametofítico y embriogénico, así como durante las fases del ciclo celular. Se analizan 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, y de diferentes especies de RNA, transcritos y genes específicos, empleando sondas y anticuerpos que las reconocen (PCNA, asociado a replicación; snRNPs, snRNAs, proteínas SR, hnRNAs, en *splicing*, híbridos DNA/RNA, en transcripción, fibrilarina y UBF, en procesamiento temprano del pre-rRNA, etc).

Desarrollo y optimización de técnicas para estudios de identificación molecular *in situ* en diferentes microscopías

Esta investigación implica varias líneas de trabajo: 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 vitro* 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

Functional organization of the nucleus in relation to developmental programs and cell cycle progression in plants

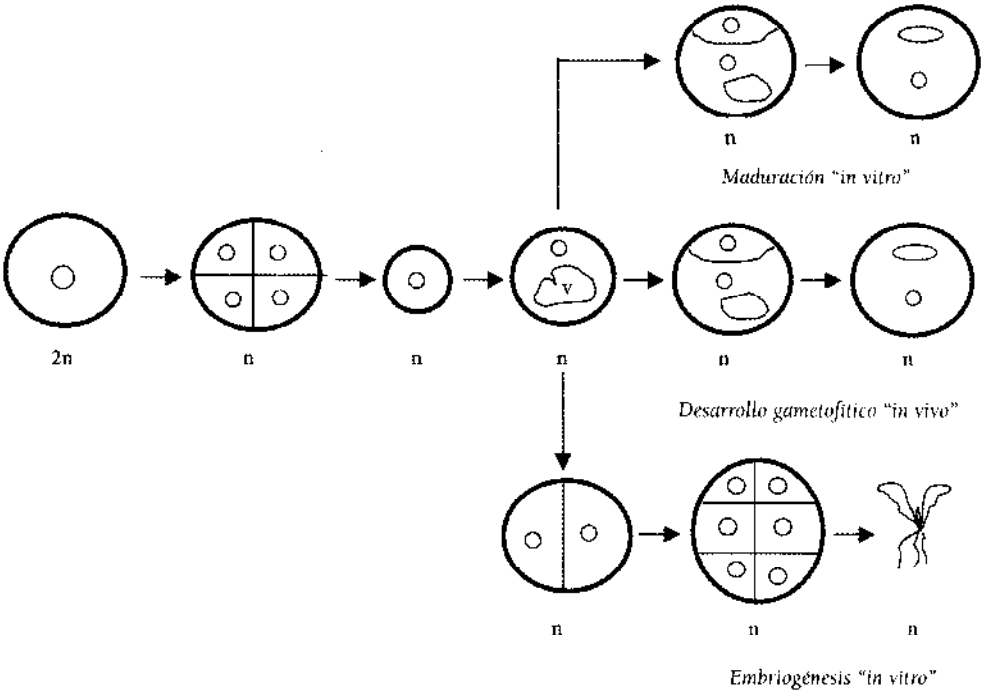
We study the dynamics of the functional domains of the nucleus in plant cells (chromatin, interchromatin region and nucleolus), in relation to the functions of DNA replication and RNA transcription, processing and transport. Their structural organization varies in relation to this activity and during the different stages of gametophytic development and embryogenesis, as well as during cell cycle periods. We analyze the changes, at subcellular and ultrastructural levels, in the localization patterns of different macromolecules involved in the synthesis and processing of DNA and heterogeneous and ribosomal RNA, various RNA species, specific transcripts and genes. We used probes and antibodies recognizing them (PCNA, associated to transcription; snRNPs, snRNAs, SR proteins and hnRNAs, involved in splicing; DNA/RNA hybrids, involved in transcription; fibrillarin and UBF, associated with early processing of pre-rRNA, etc).

Development and set up of techniques for in situ *molecular identification using different microscopies*

This topic involves various research subjects: a) Optimization of low temperature methods for processing of 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, by using probes and antibodies for detecting low amounts of molecular targets in the cell. We studied the combination of dif-*

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 distintos microscopías, láser confocal, de fluorescencia con cámara CCD, y microscopía electrónica de transmisión.

ferent visualization methods using fluorochromes, ultrasmall colloidal gold particles, and methods to amplify signals, and evaluating the results after observation in different microscopies, confocal, CCD camera, fluorescence microscope, and transmission electron microscope.



Diferentes vías de desarrollo del grano de polen *in vivo* e *in vitro*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CSIC/Academia Checa de Ciencias. (1991-1998).
— CSIC/Academia Húngara de Ciencias. (1994-1997).
— CSIC/Universidad de Viena. (1994-1998).
— DGICYT, PB95-0133. (1996-1999).
— INIA, SC98-081, (1998-2001)
— UE, BIO4-CT96-0275. (1996-1999).
— UE, COST action 824. (1995-1998).
— UE, Plant Biotechnology Network. (1995-1999).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Testillano, P.S., González-Melendi, P., Préstamo, G., Rejas, M.T., Vicente, O., and Risueño, M.C. (1997). Biología celular del desarrollo gametofítico del polen y la inducción de embriogénesis. Bol. Asoc. Palinól. Leng. Españ. 2, 2-7.

— Testillano, P.S., González-Melendi, P., Préstamo, G., Vicente, O., and Risueño, M.C. (1997). El programa de desarrollo del polen y su reprogramación hacia embriogénesis de haploides: biología celular de la fase susceptible de inducción. Bol. Soc. Españ. Fisiol. Veg. 26, 21-33.

— González-Melendi, P., Testillano, P.S., Mena, C.G., Müller, S., and Risueño, M.C. (1998). Histones and DNA distribution in plant nucleus: a combination of immunogold and cytochemical methods. Exp. Cell Res. 242, 45-59.

— Préstamo, G., Fuster, C., and Risueño, M.C. (1998). Effects of blanching and freezing on the structure of carrots cells and their implications for food processing. J. Sci. Food Agric. 77, 223-229.

— Raska, I., Pliss, A., Mandys, V., Risueño, M.C., and Lojda, Z. (1998). Processing of free cells for electron microscopy using a fibrin clot. Acta Histochem. *100*, 309-313.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— González-Melendi, P., Testillano, P.S., Ahmadian, P., and Risueño, M.C. (1997). A correlative study of rDNA organization in plant nucleolus at CLSM and TEM. En: *Electron Microscopy 96*, 3,. P. Hawkes, ed. (Charenton-le-Pont, France: SARL ERI) pp. 317-318.

— Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P., and Risueño, M.C. (1997). Dynamics of the functional organization of the plant cell nucleus by EM localization of molecular targets. En: *Electron Microscopy 96*, 3. P. Hawkes, ed. (Charenton-le-Pont, France: SARL ERI) pp. 159-160.

— Ahmadian, P., Testillano, P.S., González-Melendi, P., Fadón, B., Préstamo, G., Jiménez-Durán, G., and Risueño, M.C. (1998). Cell biology of the pollen developmental program and the induction of microspore embryogenesis in *Capsicum annuum L.* En: EUCARPIA. Palloix A., Daunay M.C., eds. (Paris: INRA Publis) pp. 183-186.

— Domenech, J., Testillano, P.S., Vergne, P., Magnard, J.L., and Risueño, M.C. (1998). Early microspore embryogenesis in maize: cellular features and *in situ* expression of embryogenesis-specific genes. En: *Anther and pollen: from biology to biotechnology*. Clement C. and Audran J.C., eds. (Reims: Univ. Reims) pp. 33.

— Risueño, M.C., Testillano, P.S., González-Melendi, P., Coronado, M.J., Préstamo, G., Seguí, J.M., Domenech, J., and Heberle-Bors, E. (1998). Stress-induced microspore embryogenesis (SIME): cellular features and specific gene expression by cryomethods. En: *Electron Microscopy 98*, Calderón-Benavides H.A., Yacamán M.J., eds. (Bristol: Inst. Physicis Publishing) pp. 23-24.

— Risueño, M.C., Testillano, P.S., and González-Melendi, P. (1998). The use of cryomethods for plant biology studies. En: *Electron Microscopy 98*, Calderón-Benavides H.A., Yacamán M.J., eds. (Bristol: Inst. Physicis Publishing) pp. 3-4.

— Testillano, P.S., González-Melendi, P., Préstamo, G., and Risueño, M.C. (1998). *In situ* hybridization with non-isotopic riboprobes to localize genes and transcripts in plants. En: *Electron Microscopy 98*, Calderón-Benavides H.A., Yacamán M.J., eds. (Bristol: Inst. Physicis Publishing) pp. 433-434.

— Testillano, P.S., González-Melendi, P., Rejas, M.T., and Risueño, M.C. (1998). *In situ* localization studies in plants by using freeze-substitution and cryoultramicrotomy. En: *Electron Microscopy 98*, Calderón-Benavides H.A., Yacamán M.J., eds. (Bristol: Inst. Physicis Publishing) pp. 5-6.

— Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (1998). Citoquímica y localización de ácidos nucleicos. En: *Manual de Técnicas de Microscopía Electrónica*, Renau-Piqueras, J., Megías-Megías, L., eds. (Granada: Ed. Universidad de Granada) pp. 319- 338.

— Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (1998). Criométodos. En: *Manual de Técnicas de Microscopía Electrónica*, Renau-Piqueras, J., Megías-Megías, L., eds. (Granada: Ed. Universidad de Granada) pp. 49-72.

— Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (1998). Hibridación *in situ* a nivel ultraestructural (con ribosondas marcadas no radioactivamente) para localizar genes y RNAs. En: *Manual de Técnicas de Microscopía Electrónica*, Renau-Piqueras, J., Megías-Megías, L., eds. (Granada: Ed. Universidad de Granada) pp. 351-360.

— Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (1998). Localización *in situ* de procesos nucleares. En: *Manual de Técnicas de Microscopía Electrónica*, Renau-Piqueras, J., Megías-Megías, L., eds. (Granada: Ed. Universidad de Granada) pp. 303-318.

— Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (1998). Reacciones moleculares *in situ* para localización ultraestructural de regiones funcionales de DNA y RNA. En: *Manual de Técnicas de Microscopía Electrónica*, Renau-Piqueras, J., Megías-Megías, L., eds. (Granada: Ed. Universidad de Granada) pp. 339-350.

Patogénesis de Virus de Plantas y Mecanismos de Resistencia en Plantas
Plant Viral Pathogenesis and Plant Defense Mechanisms

Mª Teresa Serra Yoldi
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Isabel García Luque
Investigadoras de Carrera / *Staff Scientists*
Rahouitei Jhaber (XI-XII, 1998)
Investigador Visitante / *Visiting Scientist*
Mª Isabel Elvira Guijarro (Hasta II-1998)
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*
Alberto de la Cruz (Hasta I-1998)
Patricia Gilardi Navarro
B. Predoctorales / *Graduate Students*
Sonia Castillo Lluva (Desde XII-1998)
Emiliana Liébana Allende (Hasta III-1998)
(Compartida)
Monserrat Llorente de Mingo
Personal Técnico / *Technicians*

El interés de nuestro trabajo se centra en el estudio de la patogénesis de los virus de las plantas, es decir, en conocer por qué en determinadas combinaciones huésped-parásito se establece una infección generalizada, mientras que en otras combinaciones la infección no tiene lugar debido a que en el huésped se activan de forma específica ciertos mecanismos de defensa frente al agente patógeno.

Llevamos a cabo el análisis de los mecanismos de resistencia que operan en el género *Capsicum* frente a los tobamovirus, mediante la identificación de los factores virales responsables de la inducción de la respuesta de defensa, y la caracterización de la respuesta del huésped durante la activación de dichos mecanismos.

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 (PaMMoV) y

The general aim of our work is to study plant virus pathogenesis. This is to elucidate why in certain host-pathogen combinations, plant viruses can invade systemically plants, whereas in others, disease syndromes are not produced, due to the specific activation of defence mechanisms against the invading pathogen.

We are analysing the resistance mechanisms that operate in the Capsicum *genus against the tobamoviruses through the identification of viral factors involved in the elicitation of the host response, as well as the characterization of the host response during the activation of plant defence mechanism(s).*

By constructing chimeric hybrid viruses at the cDNA level, and transient expression in leaves, we have identified the viral coat protein of paprika mild mottle virus (PaMMoV) and pepper mild mottle virus (PMMoV-S) as the viral elicitors of the L^2 and L^3 gene-mediated defence reactions, respectively. This response (hypersensitive reaction, HR) is characterized by the induction of

del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-S) son los factores virales requeridos para la inducción de la reacción de defensa mediada por los genes de resistencia L^2 y L^3, respectivamente. 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 que se inducen en la formación de la HR, a fin de identificar los genes de la planta que están involucrados en la resistencia frente a agentes patógenos con vistas a su utilización en programas de mejora genética vegetal. Usando la técnica del "*differential display*" de PCR, hemos aislado distintas bandas de cDNA asociadas específicamente a la inducción de esta respuesta, cuya clonación, secuenciación y análisis de secuencias y de su patrón de expresión se está llevando a cabo. Asimismo, hemos determinado que se induce específicamente la síntesis de ciertas proteínas, cuya expresión está regulada transcripcionalmente, y cuya identificación nos permite disponer de marcadores moleculares de la resistencia vegetal activa frente a las infecciones virales.

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. Ensayos preliminares llevados a cabo en la generación F1 con cuatro construcciones diferentes han mostrado que algunas de las líneas de plantas transgénicas de tres de estas construcciones reducen la acu-

both programmed cell death and defence genes, leading to the localization of viral infection at the primary infection sites.

In the study of the host defence response, we are analysing distinct proteins and mRNAs that are specifically induced upon the activation of this response reaction. It is our purpose to identify the host genes involved in conferring the resistance against pathogens with the aim of using them in plant breeding. Insofar, by PCR "differential display", we have isolated several cDNA bands specifically associated to the HR induction. The analysis of their nucleotide sequences and of their expression patterns are currently underway. In addition, we have identified several proteins that also accumulate during the HR activation. The expression of these proteins is regulated at the transcriptional level, and they can be used as molecular markers of the host defence reaction.

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. Preliminary data have shown that plants expressing several of these constructs exhibit a reduction in the accumulation levels of both homologous (CMV) and heterologous (tobacco mosaic virus) viruses.

We are also analysing the protective effect conferred by the constitutive expression in plants of viral antisense RNAs. Thus, in tobacco plants expressing the CMV 3a protein antisense RNA, we have detected a delay in symptoms appearance correlated to a diminished accumulation of virus.

Finally, we are studying the viral pathogenesis mechanisms, focused towards the elucidation of the effect upon photosynthesis.

mulación de CMV con distinta eficacia, llegando hasta niveles indetectables en las hojas sistémicas. Asimismo, hemos observado un efecto protector frente a virus heterólogos.

Por otro lado, estamos analizando el efecto que ejerce sobre la replicación viral la expresión constitutiva en las plantas de RNAs antisense a la proteína 3a. En estas plantas hemos observado una protección específica frente a la infección viral, que resulta en un retraso en la aparición de los síntomas y en una caída en los niveles de acumulación viral, resistencia que se mantiene a lo largo de todo el proceso infeccioso y en todos los estadios de desarrollo de la planta.

Finalmente estamos estudiando los mecanismos de patogénesis viral, centrándonos en el efecto de las infecciones virales sobre la fotosíntesis, un efecto primario de la infección viral. Hasta el momento hemos identificado las alteraciones producidas en el aparato fotosintético, y que están asociadas a la inhibición selectiva de la acumulación de las proteínas extrínsecas del Fot II, implicadas en el sistema de oxidación/fotolisis del agua.

Photosynthesis inhibition is considered to be a primary effect of viral infection. We have identified the alterations induced by the infection upon the photosynthetic apparatus. These alterations are correlated to a selective inhibition in the accumulation level of photosystem II extrinsic proteins.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 07B/0034/97 (1998-1999).

— CICYT, AGF95-0696 (1995-1998).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Alberto de la Cruz Martínez**. Patogénesis de los tobamovirus que infectan pimiento. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Directora: I. García Luque

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— De la Cruz, A., López, L., Tenllado, F., Díaz-Ruiz, J.R., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T., and García-Luque, I. (1997). The coat protein is required for the elicitation of the Capsicum L^2 gene-mediated resistance against tobamoviruses. Mol. Plant-Microbe Interact. *10*, 107-113.

— Tenllado, F, García-Luque, I., Serra, M.T., and Díaz-Ruiz, J.R. (1997). Pepper resistance-breaking tobamoviruses: can they co-exist in single pepper plants?. European J. Plant Pathol. *103*, 235-243.

— Gilardi, P., García-Luque, I., and Serra, M.T. (1998). The coat protein of pepper mild mottle virus (PMMoV-S) alone can elicit the *Capsicum* L^3 gene-mediated resistance. Mol. Plant-Microbe Interact. *11*, 1253-1257.

Artículos de divulgación/Press Articles.

— Trad, J., Lahoz Beltrá, M.C., Peña, L., Serra, M.T., y Díaz Ruiz, J.R. (1997). El virus del bronceado, un virus invasor del reino vegetal. Phytoma España *91*.

— García-Luque, I. Comentarios a la Bibliografía Internacional. Publicación Oficial Soc. Españ. Virología (en prensa, 1999).

Virología Molecular de Plantas
Plant Molecular Virology

Grupo1 / *Group 1*

José Ramón Díaz Ruiz
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Mª Carmen Lahoz Beltrá (Hasta IX-1998)
Francisco Tenllado Peralo (Hasta II-1997)
Jumana Trad Yunes (Hasta VI-1998)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Pablo González Jara
Félix Alejandro Atencio (Desde IX-1997)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Grupo2 / *Group 2*

Dionisio López Abella
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

César Llave Correas
Belén Martínez García
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Grupos/*Groups* 1 y 2

Diego Díaz Izquierdo (Hasta XII-1998)
Emiliana Liébana Allende (Hasta III-1998)
Monserrat Llorente de Mingo
Personal Técnico / *Technicians*

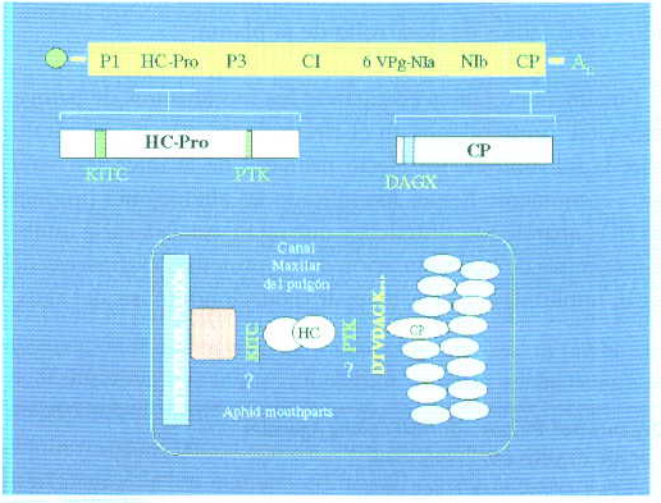


Figura: Factores virales implicados e hipótesis actual sobre el mecanismo de transmisión de potyvirus por pulgones.

Figure: Viral proteins involved in the aphid transmission process of Potyvirus according to the bridge hypothesis.

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

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

Nuestros grupos mantienen, durante los últimos años, un programa de investigación orientado hacia el control de enfermedades virales en plantas. Particularmente, el énfasis se ha puesto en: 1) la caracterización de nuevos virus emergentes que producen enfermedades de importancia económica para la agricultura española y el desarrollo de técnicas para su

Our groups maintain a research program, over the last years, focused toward the plant virus disease control. Particularly, the emphasis has been on: 1) the characterization of new, emerging viruses producing economically important diseases to the Spanish agriculture and the development of techniques for their diagnosis; 2) the study of the viral transmission by aphid vectors

diagnóstico; 2) el estudio de la transmisión de virus por pulgones vectores y la determinación de las bases moleculares del mecanismo de transmisión dependiente de componentes auxiliares codificados por el virus y 3) 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.

and the determination of the molecular basis of the viral-coded, helper component-dependant mechanism of transmission and 3) the analysis of pathogen derived, transgenic resistance strategies to viruses in plants and the elucidation of the cellular and molecular mechanisms controlling resistance

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 07B/0024/1997 (1997-1999).
— CSIC-Academia de Ciencias Húngaras (1997-1998).
— DGICYT, PB94-0023 (1995-1998).
— DGICYT, BIO97-0615-C02-01 (1997-2000).
— DGICYT, BIO98-0849 (1998-2001).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Mª Carmen Lahoz Beltrá.** Análisis de nuevas estrategias de resistencia transgénica mediada por RNA frente al tospovirus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV). Universidad Complutense de Madrid, 1998. Director: J.R. Díaz-Ruiz.

Publicaciones/*Publications*

Articulos en Revistas/*Journal Articles*

— Chu M., López-Moya, J.J., Llave-Correas, C., and Pirone, T.P. (1997). Two separate regions in the genome of tobacco etch virus contain the determinants of the wilting response of tabasco pepper. Mol. Plant-Microbe Interact. *10*, 472-480.
— De la Cruz, A., López, L., Tenllado, F., Díaz-Ruíz, J.R., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra M.T., and García-Luque, I. (1997). The coat protein is required for the elicitation of the *Capsicum* L2 gene-mediated resistance against the tobamoviruses. Mol. Plant-Microbe Interact. *10*, 107-113.
— López-Moya, J.J., López-Abella, D., Díaz-Ruíz, J.R., Martínez-García, B., and Gáborjányi, R. (1997). Serological characterization of Hungarian plum pox virus isolates. Z. Naturforsch. *52*, 391-395.
— Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T., and Díaz-Ruíz, J.R. (1997). Pepper resistance-breaking tobamoviruses: can they coexist in single pepper plants?. *Eur. J. Plant Pathol. 103*, 235-243.
— Blanc, S., Ammar, E.D., García-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J., and Pirone, T.P. (1998). Mutations in the Potyvirus helper component protein: Effects on interactions with virions and aphid stylets. J. Gen. Virol. *79*, 3119-3122.

Articulos de Divulgación/Press Articles

— Trad, J., Lahoz-Beltrá, M.C., Peña, L., Serra, M.T., y Díaz-Ruíz, J.R. (1997). El virus del bronceado, un virus invasor del reino vegetal. Phytoma, *91*, 1-6.

Entomología. Interacciones Planta-Insecto
Entomology. Insect-Plant Interactions

Pedro Castañera Domínguez
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Félix Ortego Alonso
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Manuel González Nuñez (Desde VIII-1998)
Vicente Marco Mancebón (Hasta IV-1997)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Jesús López Olguín (Hasta XI-1998)
Concepción Novillo Almendros (Hasta IV-1998)
Gema Pérez Farinós
Ismael Sánchez Ramos
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Mª Luisa Ruiz Serra
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Resistencia de plantas, inhibidores de proteasas, ácidos hidroxámicos, terpenoides, maíz-Bt.

El trabajo del grupo está orientado al estudio de los efectos de metabolitos secundarios y proteínas de defensa de plantas sobre la biología, el comportamiento y la fisiología de plagas de importancia económica mediante bioensayos con dieta artificial, discos foliares o plantas transgénicas. Así mismo, estamos investigando la biología y métodos de control de plagas agrícolas y de productos almacenados. Concretamente, estamos investigando:

Efecto de metabolitos secundarios de plantas sobre plagas agrícolas

Hemos evaluado el efecto del ácido hidroxámico DIMBOA sobre el desarrollo y la fisiología digestiva de las larvas del taladro del maíz *Sesamia nonagrioides*. Hemos analizado las

Keywords: Plant resistance, proteinase inhibitors, hidroxamic acids, terpenoids, Bt-maize.

Our work is focused on studying the effects of insecticidal plant products (secondary metabolites and proteins) on the survival, behavior and physiology of key pests. Accordingly, we have developed bioassay systems on artificial diets, on leaf disks and on transgenic plants. Additionally, we are investigating the biology and rational control strategies of major agricultural and stored product pests. Specifically, we are investigating:

Activity of plant secondary metabolites on insect pests

The hydroxamic acid DIMBOA was assessed for its effect on growth and digestive physiology of larvae of the stalk corn borer Sesamia nonagrioides. *We have examined the implications of the altered levels of proteases and detoxication enzyme activities on*

implicaciones de las alteraciones observadas en los niveles de proteasas y en las enzimas de destoxificación de las larvas alimentadas con dieta tratada con DIMBOA en ensayos de alimentación de corta y larga duración.

El fraccionamiento dirigido de los extractos de *Trichilia havanensis* ha permitido la identificación y purificación de tres limonoides: azadirona, *O*-acetiltrichilenona, 1,7-di-*O*-acetilhavanensina, que redujeron significativamente la tasa de consumo de alimento, la tasa de incremento de peso y la eficiencia del crecimiento de larvas de *Leptinotarsa decemlineata*. Las fracciones con dos limonoides fueron más activas contra *L. decemlineata* y *Spodoptera exigua* que los correspondientes compuestos puros, lo que sugiere un efecto sinérgico en las mezclas. Todos los productos activos de *T. havanensis* presentan un modo de acción tóxico frente a ambas especies de insectos.

Potencial de inhibidores de proteasas en el control de plagas

Estamos interesados en la caracterización de las proteasas del tubo digestivo de larvas de plagas de interés agrícola y su interacción con proteínas vegetales de defensa. Nuestro objetivo es seleccionar los inhibidores más adecuados para la obtención de plantas transgénicas. Hasta la fecha, hemos caracterizado las enzimas proteolíticas de varias plagas de gran importancia económica en España: el taladro del maíz, *S. nonagrioides*, el escarabajo de la patata, *L. decemlineata*, una nueva plaga de la remolacha azucarera, el curculiónido *Aubeonymus mariaefranciscae*, y el ácaro del jamón, *Tyrophagus putrescentiae*. Actualmente, estamos ensayando los efectos *in vitro* e *in vivo* de inhibidores comerciales de proteasas y de otros nuevos, suministrados en dieta artificial o expresado en plantas trangénicas, sobre dichas plagas.

Biología y control del curculiónido *A. mariaefranciscae*, plaga de la remolacha azucarera

Hemos mejorado la dieta semisintética para la cría desde neonatas a adultos de larvas de *A. mariaefranciscae*. Hemos analizado mediante RAPD la variabilidad genética de cinco

the digestive physiology of larvae feeding on DIMBOA-containing diet for short- and long-term feeding assays.

The bioassay-guided fractionation of Trichilia havanensis *seed extracts have lead to the identification and purification of three limonoids: azadirone, O-acetyltrichilenone, and 1,7-di-O-acetylhavanensin, that significantly reduced the relative consumption rate, the relative growth rate, and the growth efficiency of* Leptinotarsa decemlineata. *The fractions with two limonoids were more active against* L. decemlineata *and* Spodoptera exigua *than the corresponding pure compounds, suggesting a synergistic effect of the mixtures. The comparison of the nutritional indices showed that all the active compounds from* T. havanensis *have a toxic mode of action.*

Potential of protease inhibitors to control agricultural pests

We are interested in the characterization of digestive proteases from insect pests and their interaction with plant defense proteins. Our goal is to establish which protease inhibitors are preferred for the development of transgenic plants. So far, we have characterized the proteolytic enzymes of several important pests in Spain: the stalk corn borer, S. nonagrioides, *the Colorado potato beetle,* L. decemlineata, *a new sugar beet pest, the weevil* Aubeonymus mariaefranciscae, *and the mold mite,* Tyrophagus putrescentiae. *Actually, we are testing the in vitro and in vivo effects of commercial and novel protease inhibitors, added in artificial diets or expressed in transgenic plants, on these species.*

Biology and control of the sugar beet weevil, A. mariaefranciscae

We have improved an artificial larval diet that can be used successfully for rearing A. mariaefranciscae *from neonate to adult. We have studied the genetic variability of five populations of this weevil by RAPD analysis. The high resolution provided by RAPDs, in combination with efficient genetic distance estimators reveal an unique event of colonization, followed by the spreading of the weevil across the surrounding sugar beet areas.*

poblaciones de este curculiónido. El uso de varios estimadores de la distancia genética entre dichas poblaciones sugiere un evento de colonización único de este curculiónido, seguido de su dispersión a áreas remolacheras próximas. Así mismo, hemos probado que la selección de la planta hospedante por los adultos se debe a la presencia de un compuesto fagoestimulante no determinado, y no al reconocimiento de compuestos antiapetitivos en plantas no hospedantes; y que el lugar preferente de oviposición en plantas de remolacha fueron las raíces donde pusieron el 97% de los huevos.

Hemos determinado el patrón de penetración, distribución y excreción del hexaflumuron, insecticida regulador del crecimiento, marcado radioactivamente, así como su efecto transovarial. La penetración del [^{14}C] hexaflumuron en hembras fue un poco mayor que en machos. El pequeño porcentaje de compuesto marcado recuperado en los huevos fue suficiente para que la endo- y exocutícula del tegumento en el embrión presentara una estructura no lamelada, de apariencia amorfa y sin funcionalidad mecánica, lo que impidió su eclosión. Por otra parte, hemos observado retrasos en el desarrollo y una alta mortalidad en larvas de *A. mariaefranciscae* alimentadas con inhibidores de serin proteasas desde neonatas a pupación. La mortalidad mayor (-90%) se registró en las larvas alimentadas con una mezcla de dos o tres inhibidores, lo que sugiere un efecto sinérgico.

Estrategias para el control de los ácaros del jamón

El ácaro *T. putrescentiae* es la plaga más importante en los secaderos de jamón muestreados en España. Se ha puesto a punto un método para estudiar en el laboratorio su biología a distintas temperaturas, lo que ha permitido establecer un modelo lineal y otro no lineal (Logan tipo III) para predecir su desarrollo. En la búsqueda de compuestos naturales selectivos, no tóxicos y que no afecten a las cualidades organolépticas del jamón, hemos realizado aplicaciones por inhalación de varios monoterpenos. Los compuestos linalool, fenchona y mentona mostraron la mayor actividad acaricida contra las fomas móviles, pero no afectaron a los huevos. Mentona fue el más efectivo con una LC_{50} significativamente menor que

Additionally, we have proved that the host selection by weevils is due to the presence of an undetermined phagostimulant compound in sugar beet, instead of the recognition of deterrent substances among non-host plants; and that the preferred oviposition site was the root, where 97% of the eggs were laid.

We have studied the pattern of penetration, distribution and excretion of labeled hexaflumuron on adults of A. mariaefranciscae *and its transovarial effects. Penetration of [^{14}C] hexaflumuron in females was a little higher than in males. The low percentage of radiolabeled hexaflumuron recovered in the eggs impaired the embryo development. Both endo- and exocuticle were totally unstructured and the typical lamellated organization was absent leading to mechanical weakness and unhatched embryos. Larvae of* A. mariaefranciscae *fed from neonate to pupation on diets containing serine proteinase inhibitors endure lower survival rates and display significant delays in the developmental time to pupation and to adult emergence. The highest mortality (-90%) occurred with larvae fed on diets containing two or three inhibitors, suggesting a synergistic toxicity.*

Biology and control of dry-cured ham mites

We have established a linear and non-linear model (Logan type III) that can be used to predict the development of the mold mite T. putrescentiae, *which is a key pest of dry-cured ham stores in Spain, at constant temperatures. In the search of selective natural compounds non-toxic and no affecting the organoleptic character of this high value product, mobile stages of this mite were exposed by inhalation to several monoterpenes. Linalool, fenchone, and menthone were found to present the best miticidal activity. Menthone was the most effective, with a significatively lowest* LC_{50}. *Alarm and aggregation pheromones are under study to assess their potential to be used in a novel control strategy.*

Monitoring of stalk corn borers resistance to Bt-maize

We have just started a project to define distinct geographical populations in Spain of the stalk corn borers, S. nonagrioides *and* Ostrinia nubilalis, *and to establish their baseline of suscep-*

las demás. Actualmente, estamos evaluando el potencial de una nueva forma de control a base de feromonas de alarma y de agregación.

Evaluación de la evolución de la resistencia de los taladros al maíz Bt

Hemos iniciado un proyecto para definir las poblaciones geográficas en España de los taladros, *S. nonagrioides* y *Ostrinia nubilalis*, y para establecer la linea base de susceptibilidad a la proteína insecticida Bt. Los cambios de susceptibilidad se determinarán mediante muestreos anuales de cada población. Adicionalmente, las larvas serán sometidas a una presión para selección de resistencia en el laboratorio, con objeto de predecir su evolución en las poblaciones de campo.

tibility to the Bt-toxins. Changes in susceptibility will be determined through regular monitoring of each population. Additionally, larvae will be selected for several generations in the laboratory to forecast the potential development of resistance of field populations to the insecticidal protein.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, COR0037/94 (1995-1997).
— CAM, 06G-001-96 (1996-1997).
— CICYT, AGF95-0065-CO2-01 (1995-1997).
— CICYT, AGF98-0805-CO2-01 (1998-2001).
— INIA, SC98-046-C3-3 (1998-2001).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Jesús Francisco López Olguín.** Actividad y modo de acción de productos de *Trichilia havanensis* Jacq. y *Scutellaria alpina* subsp. *javalambrensis* (Pau), sobre *Leptinotarsa decemlineata* (Say) y *Spodoptera exigua* (Hübner). Universidad Politécnica de Madrid, 1998. Directores: Pedro Castañera Domínguez y Elisa Viñuela Sandoval.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Alfonso, J., Ortego, F., Sánchez-Monge, R., García-Casado, G., Pujol, M., Castañera, P., and Salcedo, G. (1997). Wheat and barley inhibitors active towards -amylase and trypsin-like activities from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: *Noctuidae*). J. Chem. Ecol. *23*, 1729-1742.
— López-Olguín, J. F., Budia, F., Castañera, P., and Viñuela, E. (1997). Actividad de *Trichilia havanensis* (Meliacea) sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Bol. San. Veg. Plagas, 23, 3-10.
— Marco V., Taberner A., and Castañera, P. (1997). Development and survival of immature *Aubeonymus mariaefranciscae* Roudier (Coleoptera: *Curculionidae*) at constant temperatures. Ann. Entomol. Soc. Am. *90*, 169-176.
— Novillo, C., Castañera, P., and Ortego, F. (1997). Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado Characterizpotato beetle larvae. Arch. Insect Biochem. Physiol. *36*, 181-201.
— Novillo, C., Castañera, P., and Ortego, F. (1997). Inhibition of digestive trypsin-like proteases from larvae of several lepidopteran species by the diagnostic cysteine protease inhibitor E-64. Insect Biochem. Mol. Biol. *27*, 247-254.
— Ortego, F., and Bowers, W.S. (1997). Biological activities of two juvenoids on nymphs of the American bird grasshopper *Schistocerca americana* (Drury). Insect Sci. Appli. *16*, 357-361.

— Ortego, F., Evans, P.H., and Bowers, W.S. (1997). Enteric and plant derived deterrents in regurgitate of American bird grasshopper, *Schistocerca americana*. J. Chem. Ecol. *23*, 1941-1950.

— Taberner A., Dopazo, J., and Castañera, P. (1997). Genetic characterization of populations of a de novo arisen sugar beet pest *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera, *Curculionidae*), by RAPD analysis. J. Mol. Evol. *45*, 24-31.

— López Olguín, J., De La Torre, M. C., Viñuela, E., and Castañera, P. (1998). Actividad de extractos de semillas de *Trichilia havanensis* Jacq. (Meliaceae) sobre larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner).

— Marco V., Pérez-Farinós, G., and Castañera, P. (1998). Effects of hexaflumuron on transovarial, ovicidal and progeny development of *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: *Curculionidae*). Environ. Entomol. 27, 812-816.

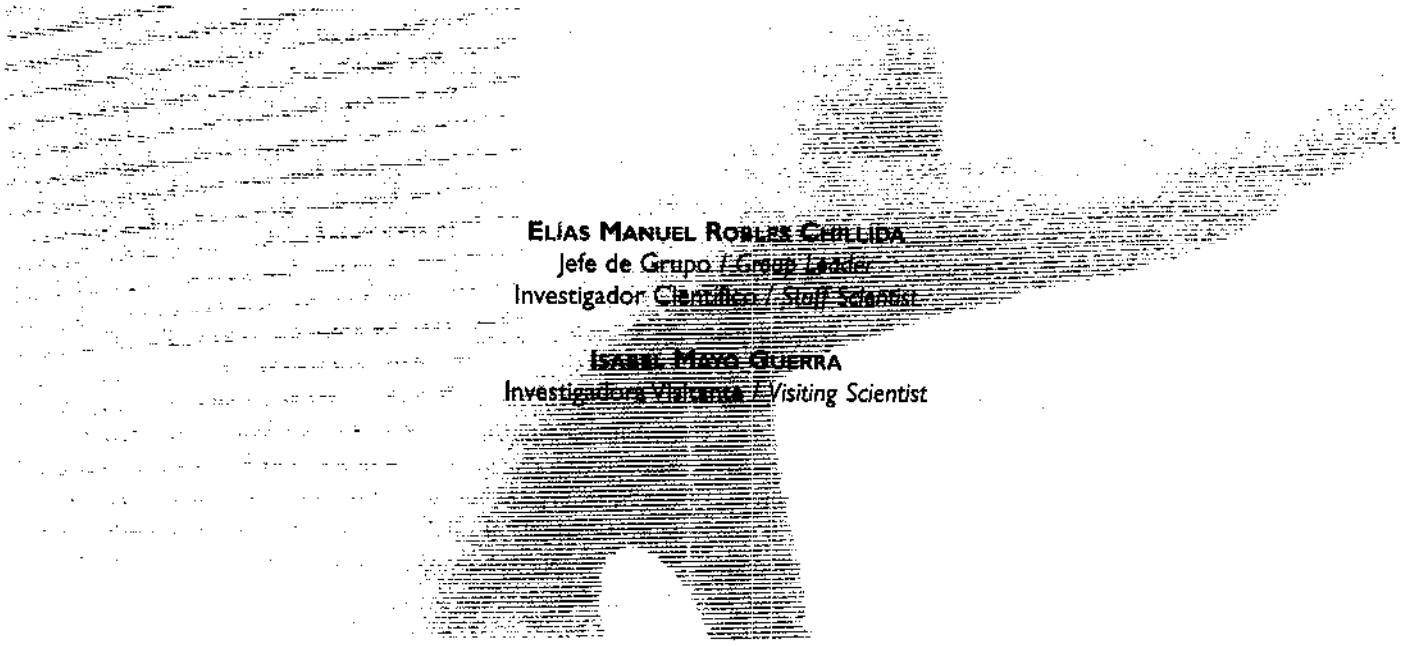
— Marco, V., López-Olguín J.F., Ortego, F., and Castañera, P. (1998). Restricted host range of the weevil *Aubeonymus mariaefranciscae*, a new sugar beet pest. Entomol. Exp. Appl. *87*, 201-207.

— Ortego, F., Farinós, G. P., Ruiz, M., Marco, V., and Castañera P. (1998). Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariaefranciscae* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. Entomol. Exp. Appl. *88*, 265-274.

— Ortego, F., Ruiz, M., and Castañera, P. (1998). Effect of DIMBOA on growth and digestive physiology of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: *Noctuidae*) larvae. J. Insect Physiol. *44*, 95-101.

— Pérez-Farinós, G., Smaghee, G., Marco, V., Tirry, L., and Castañera, P. (1998). Effects of topical application of hexaflumuron on adult sugar beet weevil, *Aubeonymus mariaefranciscae* on embryonic development: pharmacokinetics in adults and embryos. Pest. Biochem. Physiol. *61*, 169-182.

Quimiorrecepción en Insectos
Chemical Communication in Insects



Elías Manuel Robles Cerillida
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador Científico / *Staff Scientist*

Isabel Mayo Guerra
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

Formaciones sensitivas: localización, ultraestructura y función

Dada la gran controversia acerca de la identificación de las poblaciones de *Bemisia tabaci*, hemos tratado de encontrar diferencias significativas que pudieran identificarlas como biotipos distintos.

Los estudios se realizaron sobre la cara dorsal del 4° estadío larvario de dos poblaciones de *Bemisia tabaci*: La yá bien conocida como "tipo B" y otra nueva denominada "tipo no B". Nuestra atención se centró principalmente en las formaciones sensitivas y acúmulos céreos, determinándose su localización, morfología estructural y posible función.

En el "tipo B" los acúmulos de cera torácicos y caudales son escasos, siendo más estrechos y menos patentes que en el "tipo no B". Se determinó la existencia de 7 pares de formaciones sensitivas cortas, asociadas a la cabeza, protórax, mesotórax y 1°, 3°,

Sensitive formations: location, ultrastructure and function.

In view of the great controversy about the identification of populations of Bemisia tabaci, *we have tried to find some significative differences for recognize as various biotypes.*

Studies have been carried out on the dorsal face on the 4th pupal case of two populations of Bemisia tabaci: *The world-wide well known as "type B" and a new one named "non B type". Our attention centres on the sensitive formations and the accumulation of wax, determining its location, ultrastructural morphology and its possible function.*

In the "B type", thoracic and caudal wax fringes are scarce, and narrower and less robust than in the "non B type". In the "non B type", it was found the presence of 7 pairs of short dorsal sensitive formations, associated with the head, the prothorax, the mesothorax and the 1st, 3rd, 5th and 8th abdominal segment. In contrast with those findings, in the pupal case of the "B type", we

5º y 8º segmento abdominal en el "tipo no B". Por el contrario, en el "tipo B" solamente se pudo poner de manifiesto la presencia de 4 pares de formaciones sensitivas dorsales largas y 1 par de formaciones dorsales cortas. Finalmente, se observó la existencia de 4 pares de formaciones submarginales en el "tipo no B", en contraposición a los 3 pares en el "tipo B".

Estos resultados son interesantes debido a la posible diferencia en cuanto a la incidencia sobre los cultivos (grado de lesión, transmisión de virus) de estos biotipos, y su influencia en la aplicación de métodos de control biológico para esta plaga.

Alteraciones morfológicas inducidas por estrés oxidativo

Los radicales libres, incluyendo las especies activas de oxígeno, pueden provocar mecanismos de toxicidad, que sobrepasan los sistemas de defensa del organismo, dando lugar a una situación de estrés oxidativo. Esta situación puede inducirse mediante agentes de diversa naturaleza. En nuestro caso, hemos empleado el alcohol etílico, dado que es una de las drogas más consumidas por la población, con una gran incidencia en la enfermedad hepática alcohólica.

Mediante la administración de una dieta alcohólica, hemos inducido una situación de estrés oxidativo, que llega a producir lesiones celulares al generarse especies activas de oxígeno y radicales libres.

Las lesiones más significativas se observan a nivel de microsomas, membranas celulares, mitocondrias y células de Kupffer.

Bioquímica farmacológica y toxicológica. Morfología funcional

Colaboración con el Departamento de Bioquímica Farmacológica y Toxicológica del Instituto de Bioquímica (C. Mixto CSIC-UCM), Facultad de Farmacia.

only found the presence of 4 pairs of enlarged dorsal sensitive formations and 1 pair of short dorsal formations. Finally, the presence of 4 pairs of anterior submarginal formations was revealed on the "non B type", in contrast to 3 pairs in the "B type".

These results are very interesting due to the possible differential incidence on crops (damage, virus transmission) of these biotypes, and their influence in the application of biological control of this pest.

Morphological alterations induced by oxidative stress.

Free radicals, including the active species of oxygen, induce toxicity mechanisms overload the protection systems of the organism, giving rise to that oxidation stress situation. This situation can be induced by means of different agents. In our case, we have used the ethylic alcohol given that it is the drug most consumed by the people, who suffer the most incidences of the alcoholic hepatic disease.

With the administration of an alcoholic diet, a situation of oxidative stress is produced, which generate cellular alterations, as a result of the appearance of the active species of oxygen and free radicals.

The most significant lesions have been observed at the level of microsomes, cellular membranes, mitochondria and Kupffer cells.

Pharmacology and toxicology biochemical. Functional morphology

In collaboration with Departamento de Bioquímica Farmacológica y Toxicológica del Instituto de Bioquímica (C. Mixto CSIC-UCM), Facultad de Farmacia.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— FISS, 95-0032-01 (1995-1997).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Beitia, F., Mayo, I., Robles-Chillida, E.M., Guirao, P., and Genis, J.L. (1977). Current status of *Bemisia tabaci* (*Gennadius*) in Spain: The presence of biotypes of this species. IOBC/WPRS Bull. *20* (4), 99-107.

— Cascales, M., Robles-Chillida, E.M., Cascales, C., and Santos-Ruiz, M.A. (1997). Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo. Monografía IV. Real Acad. Farmacia, 267-285.

— Mayo, I., Garrido, A., and Robles-Chillida, E.M. (1997). Estudio ultraestructural de los órganos sensitivos en el oviscapto de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: *Tephritidae*). Phytoma *86*, 38-44.

— Cascales, M., Robles-Chillida, E.M., Cascales, C. and Santos-Ruiz, M.A. (1998). Intoxicación etílica y estrés oxidativo. Facoma, 11-18.

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

Jefe de Departamento *Department Head*	GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO JUAN M. RAMÍREZ DE VERGER LOBO (Hasta X-1997)
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	PALOMA LÓPEZ GARCÍA
Científicos Titulares	SANTIAGO LAMAS PELÁEZ ALBERTO MARQUET ESPINOSA († IX-1998) EDUARDO RIAL ZUECO GERMÁN RIVAS CABALLERO LUIS I. RIVAS LÓPEZ ANTONIO ROMERO GARRIDO
Personal Técnico	MARÍA TERESA ALDA LÓPEZ Mª ANGELES CORRALES GONZÁLEZ CONCEPCIÓN FERNÁNDEZ-CABRERA BAZÁN ROSA MARTÍNEZ-DALMAU LUCAS OYA TARDÍO PILAR ZARAGOZA JIMÉNEZ MERCEDES ZAZO GUIO
Secretaria	Mª DEL CARMEN PANTOJA ROYO LACABA

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

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

Peter Klatt (Desde X-1997)
Mª Dolores Pérez-Sala Gozalo
Investigadores Contratados / Research *Associates*

Mª Luisa Diez Marqués (I-IX, 1997)
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

Mariela Díaz Cazorla
Octavio Hernández Perera (Hasta VI-1998)
F. Javier Navarro Antolín
Estela Pineda Molina (Desde II-1998)
Rafael Sánchez-Pascuala (Hasta VIII-1998)
Estrella Soria López (Desde IX-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Palabras clave: Oxido nítrico, señalización redox, expresión génica, endotelio vascular, mesangio renal.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre, gaseoso, con múltiples acciones biológicas. Entre las mejor definidas se encuentran la regulación del tono vascular, la regulación de la neurotransmisión y la participación en la inmunidad no específica. Muchas de sus acciones tienen como efector al GMPc, ya que el NO es un potente activador de la guanilato ciclasa soluble. La síntesis de NO se realiza a partir de L-arginina, en un proceso complejo catalizado por una familia de óxido-reductasas, las óxido nítrico sintasas (NOS).

El interés del laboratorio se centra en comprender cómo el NO es capaz de contribuir a regular procesos celulares generales como la expresión génica, además de identificar puntos de interacción entre la vía de síntesis del NO y la de otros factores vasoactivos de la pared vascular como la endotelina y las prostaglandinas. En células mesangiales humanas hemos observado que el NO tiene un papel dual sobre la expresión de la ciclooxigenasa-

Keywords: Nitric oxide, redox signaling, gene expression, vascular endothelium, renal mesangium.

Nitric oxide (NO) is a gaseous free radical with multiple biological actions. Among the best defined are the regulation of vascular tone, regulation of neurotransmission and the participation in non specific immunity. Many of its actions utilize cGMP as an effector, as NO directly activates soluble guanylate cyclase. The synthesis of NO takes place through the action of a family of oxidoreductases termed nitric oxide synthases (NOS) which use the amino acid L-arginine as a substrate.

The interest of our laboratory focuses on understanding how NO may contribute to regulate general cellular processes such as gene expression as well as in identifying cross-talk pathways between the route of NO synthesis and those of other vasoactive factors within the vascular wall, namely endothelin and prostaglandins. In human mesangial cells we have observed that NO exerts a dual role on the expression of cyclooxygenase-2, potentiating the action of cytokines at early time points but inhibiting it at

2 potenciando la acción de las citoquinas en una fase inicial pero inhibiéndola mas tardíamente, y que este efecto se correlaciona de manera estrecha con la activación del factor de transcripción NFκB. Este efecto dual es extensivo a la propia iNOS y tiene que ver en parte con la generación de GMPc dependiente de NO.

Además estamos interesados en conocer cómo determinados fármacos de uso clínico amplio (estatinas e inmunosupresores) modifican rutas de señalización en el endotelio vascular implicadas en la expresión de factores endoteliales vasoactivos. En este sentido hemos demostrado que la Ciclosporina A aumenta la expresión de la eNOS y la síntesis de NO y que ello está en parte asociado a la síntesis de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y a la activación del factor transcripcional AP-1. También hemos observado que las estatinas (inhibidores de la síntesis de HMG CoA reductasa) inhiben poderosamente la síntesis de endotelina-1, un potente vasoconstrictor, y la expresión del gen que la codifica, la pre-pro endotelina-1 a nivel transcripcional, contribuyendo a explicar en parte la mejoría de la disfunción endotelial en pacientes tratados con estos inhibidores de la síntesis de colesterol. En el momento actual estamos intentando comprobar si estos efectos están relacionados con inhibición de la isoprenilación de proteínas críticas para la correcta expresión de la pre-pro endotelina 1.

Asimismo, utilizando como modelo el dominio de unión al DNA del factor de transcripción cJun, hemos observado que el NO induce una glutationilación selectiva de la cisteína que confiere sensibilidad redox a esta proteína. Esta modificación se correlaciona estrechamente con una inhibición de la unión al DNA. Creemos que la glutationilación podría representar un mecanismo bioquímico por el que las especies reactivas derivadas de oxígeno y nitrógeno, por mecanismos independientes, acoplan las señales generadas por estrés oxidativo y nitrosativo, a la activación o inactivación de rutas específicas de transcripción.

later stages. This effect correlated temporally with the activation of the transcription factor NFκB. This scheme can be extended to iNOS itself, in a process where the generation of cGMP is also participating.

We are also interested in gaining insight into how certain drugs which are widely employed in the clinic (statins and immunosuppressors) modify signalling routes in the vascular endothelium involved in the expression of endothelial vasoactive factors. We have shown that Cyclosporine A increases eNOS expression as well as NO synthesis and that this is in part related to the generation of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) and to the activation of the transcription factor AP-1. We have also observed that statins (HMG-CoA reductase inhibitors) powerfully inhibit the synthesis of endothelin-1 (ET-1) and the expression of the gene, pre-pro endothelin-1 through transcriptionally-related mechanisms. This may contribute to explain in part the improvement in the endothelial dysfunction observed in patients treated with these inhibitors of cholesterol synthesis. At present we are trying to explore whether protein isoprenylation is necessary for a correct expression of ET-1.

In addition, using as a model the DNA binding domain of the cJun transcription factor, we have observed that NO induces a selective glutathionylation of the cysteine which is sensitive to redox control. This modification is tightly correlated with the inhibition of DNA binding to purified cJun. We believe that glutathionylation may represent a mechanism by which nitrosative and oxidative stress, by independent biochemical mechanisms, may transduce signals into a functional response, activating or inhibiting specific transcription pathways.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— Beca Marie Curie BMH4-CT98-5052
— CAM, 07/096/96 (1997).
— CICYT SAF97-0035 (1997-2000).
— Instituto "Reina Sofía" de Investigaciones Nefrológicas (IRSIN).
— Merck, Sharp & Dohme (1998-1999).
— Parke-Davis S.A. (1997).
— UE, BIOMED-2 Acción Concertada BMH4-CT96-0979 (1996-1998).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Susana López Ongil.** Regulación de la óxido nítrico síntasa endotelial constitutiva y contractilidad endotelial. su importancia en situaciones fisiopatológicas. Universidad de Alcalá de Henares, 1997. Directores: S. Lamas y M. Rodríguez Puyol.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Lamas, S., Hernández Perera, O., Navarro Antolín, J., López-Ongil, S., Pérez-Sala, D., Rodríguez-Puyol, M., and Rodríguez-Puyol, D. (1997). Regulation of endothelial NO synthase (NOS-3) expression in situations of vascular injury. Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol. *19* (supp A): 13-15.
— Rivas-Cabañero, L., Rodríguez-López, A.M., Martínez-Salgado, C., Saura M., Lamas, S., and López-Novoa, J.M. (1997). Gentamycin treatment increases mesangial nitric oxide production. Exp. Nephrol. *5*: 23-30.
— Pérez-Sala, D., Díaz Cazorla M., Ros, J., Jiménez, W., and Lamas, S. (1997). Tetrahydrobiopterin modulates cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells Biochem. Biophys. Res. Commun. *241*, 7-12.
— Hernández Perera, O., and Lamas, S. (1998). Disfunción endotelial en la aterosclerosis: papel protector de las estatinas. Nefrología XVIII, supp *1*, 100-110.
— Hernández Perera, O., Pérez-Sala, D., Navarro Antolín, J., Sánchez Pascuala, R., Hernández, G., Díaz, C., and Lamas, S (1998). Effects of the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, Atorvastatin and Simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. J. Clin. Invest. *101*, 2711-2719.
— Lamas, S., Pérez-Sala, D., and Moncada S. (1998). Nitric oxide: from discovery to the clinic. Trends. Pharmacol. Sci. (TIPS) *19*, 436-438.
— López-Ongil, S., Hernández Perera, O., Navarro Antolín, J., Pérez de Lerma, G., Rodríguez-Puyol, M., Lamas, S., and Rodríguez-Puyol, D. (1998). Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. Brit. J. Pharmacol. *124*, 447-454.
— Navarro Antolín, J., Hernández Perera, O., and Lamas, S. (1998). Efecto de los inmunosupresores CsA y FK506 sobre vías de señalización intracelular y expresión génica en el endotelio. Nefrología XVIII, supp *1*: 79-83.
— Navarro Antolín, J., Hernández Perera, O., López-Ongil, S., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., and Lamas, S (1998). CsA and FK506 upregulate eNOS expression: role of reactive oxygen species and AP-1. Kidney Intern. Vol *54*, supp 68 : S20-S24.
— Pérez-Sala, D., Gilbert, B.A., Rando, R.R., and Cañada, F.J. (1998). Analogs of farnesylcysteine induce apoptosis in HL-60 cells. FEBS Lett. *426*, 319-324.
— Saura, M., Zaragoza, C., Díaz Cazorla M., Hernández Perera, O., Eng, E., Lowenstein, C.J., Pérez-Sala, D., and Lamas, S. (1998). Involvement of transcriptional mechanisms in the inhibition of NOS2 expression by dexamethasone in rat mesangial cells. Kidney Int. *53*: 38-49.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Bosch, R., and Lamas S. (1997). Impacto de la biología molecular en el diagnóstico de las enfermedades renales. En Nefrología Clínica. L. Hernando, ed. (Ed. Panamericana), pp 102-106.
— Caramelo, C., and Lamas S. (1997). Regulación general del tono vascular. En Nefrología Clínica. L. Hernando, ed. (Ed. Panamericana), pp 158-64.
— Domínguez, C., and Lamas S. (1997). Biología Celular Molecular del Endotelio. En Enfermedad Vascular e Hipertensión Arterial. J. Díez, ed. (Harcourt-Brace), pp 37-52.
— Lamas, S., and Michel, T. (1997). Molecular biological features of nitric oxide synthase isoforms. In Nitric oxide and the lung. W. Zapol, ed. (Marcel Dekker, New York), pp. 59-73.
— Lamas, S., and Michel, T. (1997). Endothelium-derived nitric oxide and control of vascular tone. In Principles of Molecular Medicine. Larry Jameson, ed. (Humana Press), pp. 141-144.
— López-Farré, A., and Lamas S. (1997). Factores de la pared vascular con capacidad vasoactiva. En Nefrología Clínica. L. Hernando, ed. (Ed. Panamericana), pp 165-72.
— López-Novoa, J.M., Tejedor, A., and Lamas S. (1997). Conceptos básicos de fisiología renal. En Nefrología Clínica. L. Hernando, ed. (Ed. Panamericana). pp 11-28.
— Michel, T., Lamas, S., and Sase K. (1997). Molecular Biology of Nitric Oxide Synthases. In Molecular Biology of the Cardiovascular System. A. Marks and M. Taubman, eds. (Marcel Dekker, New York).

Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores
Mitochondrial Bioenergetics: Uncoupling Mechanisms

Eduardo Rial Zueco
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

María del Mar González Barroso (Hasta VII-1998)
Sonia Bañuelos Rodríguez (Desde IX-1998)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Sira Iturrizaga Correcher (Desde IV-1998)
B. Predoctoral / *Graduate Student*

Pilar Zaragoza Jiménez
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Mitocondria, desacoplamiento, transporte, *S.cerevisiae*, bioenergética, obesidad.

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.

En las mitocondrias del tejido adiposo pardo la proteína desacoplante (UCP1) permite la re-entrada de los protones a la matriz disipando, por tanto, el gradiente de potencial electroquímico. Su actividad se encuentra regulada, siendo inhibida por nucleótidos de purina y activada por ácidos grasos. Por otra parte, la UCP1 es miembro de la familia de transportadores de la membrana interna mitocondrial. El hallazgo de que bajo determinadas condiciones estos transportadores pierdan su

Keywords: Mitochondria, uncoupling, transport, S.cerevisiae, bioenergetics, obesity.

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.

Brown fat mitochondria possess an uncoupling protein (UCP1) which catalyzes proton reentry into the matrix thus dissipating its electrochemical potential gradient. UCP1 activity is regulated, being inhibited by purine nucleotides and activated by fatty acids. 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 loose their specificity and behave like channels or like pores has led to the proposal of the existence, within the protein, of an intrinsic channel

especificidad y actúen 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 conferirían al transportador sus propiedades específicas. Uno de nuestros objetivos es 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 1997 se publicó el descubrimiento de la UCP2, una proteína que presenta una gran homología estructural y funcional con la UCP1. El estudio de la regulación de la actividad de esta proteína desacoplante es una nueva tarea de nuestro grupo, siendo de un alto interés por el posible papel de la UCP2 en el control del peso corporal. Durante la década de los 80 se dedicaron enormes recursos al estudio del papel del tejido adiposo pardo en la obesidad tras el descubrimiento de que este tejido era el responsable de eliminar el exceso de calorías en ratones sobrealimentados. Sin embargo en el hombre adulto apenas hay tejido adiposo pardo y por tanto no tiene capacidad para controlar el peso corporal. El hecho de que la UCP2 se encuentre en numerosos tejidos humanos, y en particular en los adipocitos blancos, y que se haya demostrado que la leptina induce la expresión de la UCP2, hace que esta proteína sea considerada como una nueva diana para el tratamiento de la obesidad.

La tercera línea de trabajo parte del descubrimiento, en el seno de nuestro grupo, de un mecanismo que permite modular la eficiencia de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Este mecanismo desacoplador es activado por el ATP citosólico e inhibido por ADP y fosfato. El sistema tiene dos componentes: uno permite aumentar la actividad de la citocromo *c* oxidasa mientras que el otro abre una vía que permite el paso de aniones y que puede llegar a colapsar el gradiente de potencial electroquímico de protones. La finalidad de esta vía podría ser la de permitir la rápida oxidación del exceso de NAD(P)H que se produce cuando las levaduras crecen en aerobiosis con una fuente de carbono única. Nuestro objetivo es identificar las proteínas responsables de estas actividades y esclarecer las situaciones fisiológicas en que es operativo.

which would be hidden by the domains that confer the specific transport properties to each carrier. One of our objectives is to determine the domains in UCP1 that confer the specificity to the protein and that are implicated in its regulation. Our work is centred on the study of the three UCP1 domains located on the matrix side of the membrane.

The discovery of a new uncoupling protein, named UCP2, was reported in 1997. This protein displays a high structural and functional homology with UCP1 but interestingly it is expressed in many human tissues. Our group is interested in the study of the regulation of the activity of UCP2. During the 80's a lot of effort concentrated in the study of the role of brown adipose tissue in energy balance since it had been described that this tissue was responsible for the elimination of excess calories in overfed animals. However, in the adult human brown adipose tissue is almost absent and thus it has no capacity to control body weight. The fact that UCP2 is present in many human tissues, particularly in white adipose tissue, and that it has been demonstrated that UCP2 expression is increased in mice fed a high-fat diet and by leptin, seems to indicate that this protein could be a good target for the development of new anti-obesity compounds.

The third line of research derives from our discovery of a mechanism that controls the phosphorylation efficiency in Saccharomyces cerevisiae mitochondria. This uncoupling mechanism is activated by cytosolic ATP and inhibited by ADP and phosphate. The system has two components: one increases the activity of cytochrome c oxidase while the other facilitates anion permeation and can lead to the collapse of the proton electrochemical potential gradient. The purpose of this uncoupling pathway would be to allow rapid oxidation of the excess NAD(P)H produced when yeast are grown under aerobic conditions with a single carbon source. Our group is trying to identify the proteins involved and to establish the physiological conditions in which this uncoupling mechanism is operative.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

— CICYT, Petri 95-0262-OP (1998-2000).

— DGES, PB95-0118 (1996-1999).

— Human Frontier Science Program, RG0307/1998-M (1998-2001).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Mª Mar González Barroso.** Caracterización de dominios implicados en el control del transporte en la proteína desacoplante de las mitocondrias del tejido adiposo pardo. Universidad Complutense de Madrid, 1998. Director: E. Rial.

Patentes / Patents

Solicitud de patente

— Bouillaud, F., Ricquier, D., and Rial, E. (1998). Utilización de un compuesto de tipo retinoide para modular in vivo la actividad desacopladora de la proteína UCP2. Nº registro: PCT/ES98/00225. Entidad Titular: CSIC-CNRS.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

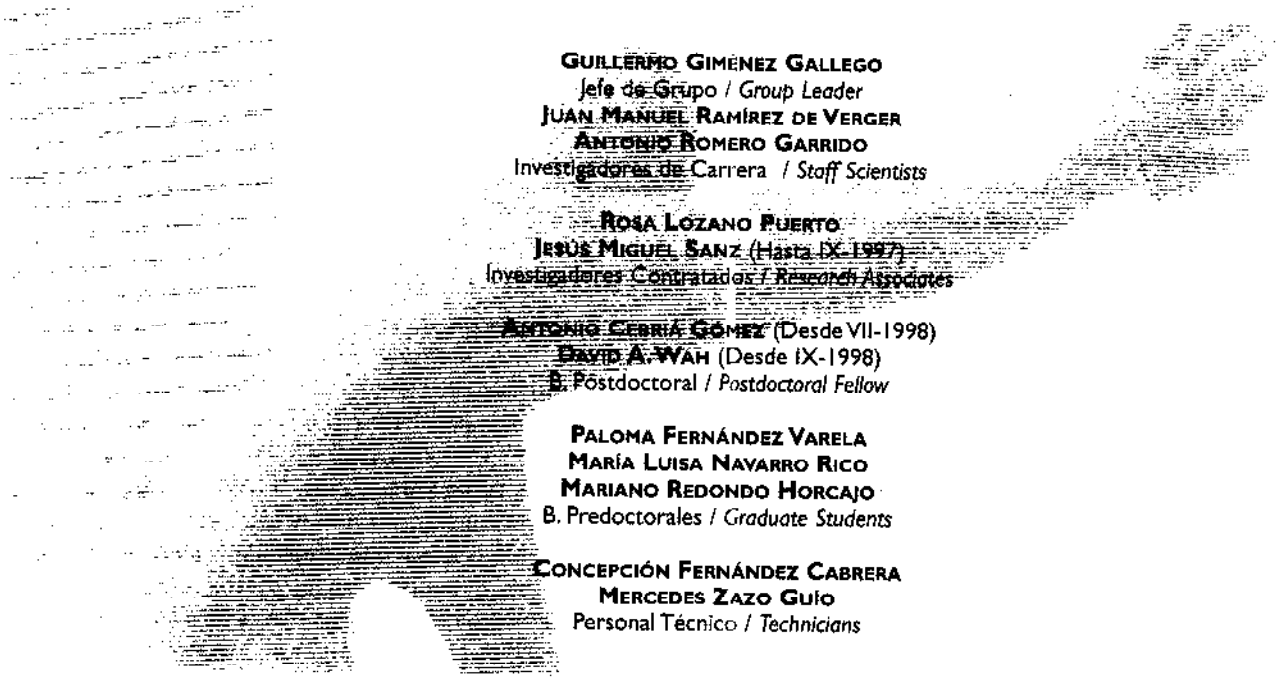
— González-Barroso, M.M., Fleury, C., Levi-Meyrueis, C., Zaragoza, P., Bouillaud, F., and Rial, E. (1997). Deletion of amino acids 261-269 of the brown fat uncoupling protein converts the carrier into a pore. Biochemistry *36*, 10930-10935.

— Alvarez-Fortes, E., Ruiz-Pérez, R.M., Bouillaud, F., Rial, E., and Rivas, L. (1998). Expression and regulation of uncoupling protein 1 from brown adipose tissue in *Leishmania major* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. *93*, 191-202.

— González-Barroso, M.M., Fleury, C., Bouillaud, F., Nicholls, D.G., and Rial, E. (1998). The uncoupling protein UCP1 does not increase the proton conductance of the inner mitochondrial membrane by functioning as a fatty acid anion transporter. J. Biol. Chem. 273, 15528-15532.

— Rial, E., González-Barroso, M.M., Fleury, C., and Bouillaud, F. (1998). The structure and function of the brown fat uncoupling protein UCP1: current status. Biofactors 8, 209-219.

Biología Estructural de Proteínas
Structural Biology of Proteins



Guillermo Giménez Gallego
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Juan Manuel Ramírez de Verger
Antonio Romero Garrido
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Rosa Lozano Puerto
Jesús Miguel Sanz (Hasta IX-1997)
Investigadores Contratados / *Research Associates*

Antonio Cebrià Gómez (Desde VII-1998)
David A. Wah (Desde IX-1998)
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

Paloma Fernández Varela
María Luisa Navarro Rico
Mariano Redondo Horcajo
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Concepción Fernández Cabrera
Mercedes Zazo Guio
Personal Técnico / *Technicians*

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 desarrollo 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.

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 members 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-reperfusion insults, and tumour treatment.

Nuestro grupo ha llevado a la vez estudios estructurales sobre otras proteínas entre las que se incluyen proteínas de transferencia electrónica como la plastocianina y la flavodoxina. También deben destacarse los llevados a cabo con PSP-I/PSP-II, un heterodímero compuesto por dos glicoproteínas de aproximadamente 15 kDa por monómero. La resolución llevada a cabo por el método de reemplazamiento isomorfo supuso, a nuestro entender, una de las primeras estructuras resueltas en nuestro país por el método MIR.

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 llevar a cabo estudios estructurales de baja resolución. A lo largo del presente año se instalará un difractómetro de rayos X para macromoléculas biológicas. Nuestro grupo tiene también acceso al espectrómetro de resonancia magnética nuclear del Instituto de Estructura de la Materia.

At the same time, our group has carried out, structural studies on other relevant proteins,. including the electron transfer proteins plastocyanin and flavodoxin, and PSP-I/PSP-II, a heterodimer of two glycoproteins of around 15 kDa. These structures were determined out using the isomorphous replacement method. This is one of the first times that this approach has been applied in our country to the determination of the three-dimensional structure of proteins by X-ray diffraction.

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. An image plate diffractometer is in the process of installation.

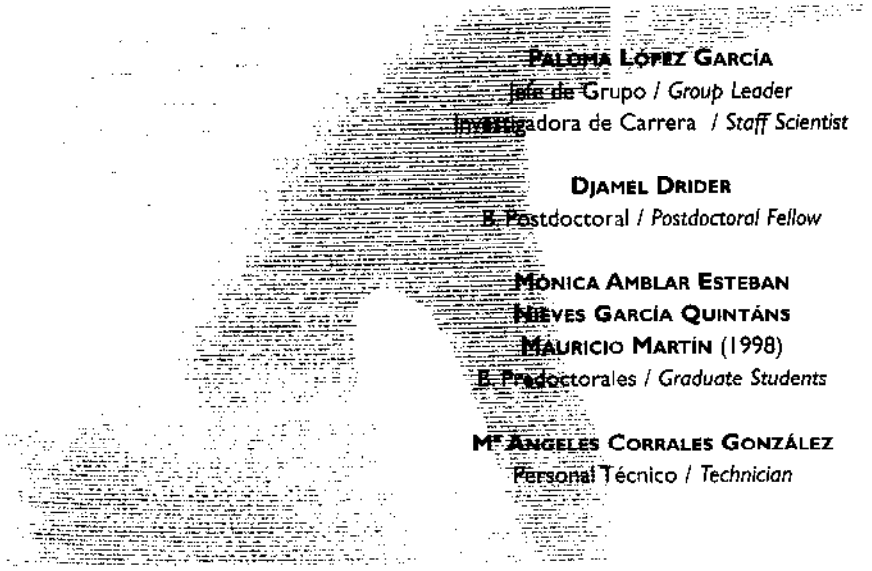
Organismos Financiadores/*Funding Agencies*
— DGICYT, PB-93 0044 (1994-1997).
— CICYT, BIO96-0411 (1996-1999).
— Boehriger Ingelheim S.A.

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*
— **Paloma Fernández Varela.** Análisis estructural en lectinas animales. Un nuevo plegamiento: el dominio CUB. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Director: A. Romero Garrido.

Publicaciones/*Publications*
Artículos en Revistas/*Journal Articles*
— Calvete, J.J., Schrader, M., Raida, M., McLane, M.A., Romero, A., and Niewiarowski, S. (1997). The disulphide bond pattern of bitistatin, a disintegrin isolated from the venom of the viper *Bitis arietans* FEBS Lett. *416*, 197-202.
— Cuevas, P., and Giménez-Gallego, G. (1997). Role of fibroblast growth factors in neural trauma. Neurol. Res. *19*, 254-256.
— Cuevas, P., Barrios, V., Giménez-Gallego, G., Martínez-Coso, V., Cuevas, B., Benavides, J., García-Segovia, J., and Asín-Cardiel, E. (1997). Serum levels of basic fibroblast growth factor in acute myocardial infarction. Eur. J. Med. Res. 2, 282-284.
— Cuevas, P., Carceller, F., Cuevas, B., Giménez-Gallego, G., and Martínez-Coso, V. (1997). A non-mitogenic form of acidic fibroblast growth factor reduces neutrophil infiltration in rat reperfused heart. Eur. J. Med. Res. 2, 139-143.
— Cuevas, P., Carceller, F., Hernández-Madrid, A., Cuevas, B., Martínez-Coso, V., and Giménez-Gallego, G. (1997). Protective effects of acidic fibroblast growth factor against cardiac arrhythmias induced by ischemia and reperfusion. Eur. J. Med. Res. 2, 33-36.
— Cuevas, P., Carceller, F., Lozano, R.M., Crespo, A., Zazo, M., and Giménez-Gallego, G. (1997). Protection of rat myocardium by mitogenic and nonmitogenic fibroblast growth factor during post-ischemic reperfusion. Growth Factors *15*, 29-40.

— Cuevas, P., De Paz, V., Cuevas, B., Marín-Martínez, J., Picón-Molina, M., Fenández-Pereira, A., and Giménez-Gallego, G. (1997). Osteopromotion for cranioplasty: an experimental study in rats using acidic fibroblast growth factor. Surg. Neurol. *47*, 242-246.
— Cuevas, P., Reimers, D., Carceller, F., Martínez-Coso, V., Redondo-Horcajo, M., Saenz de Tejada, I., and Giménez-Gallego, G. (1997). Fibroblast growth factor-1 prevents myocardial apoptosis triggered by ischemia reperfusion injury. Eur. J. Med. Res. *2*, 465-468.
— Dias, J.M., Carvahlo, A.L., Kölln, I., Calvete, J.J., Töpfer-Petersen, E., Varela, P.F., Romero, A., Urbanke, C., and Romao, M.J. (1997). Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of aSFP, a bovine seminal plasma protein with a single CUB domain architecture. Protein Sci. *6*, 725-727.
— Lozano, R.M., Rivas, G., and Giménez-Gallego, G. (1997). Destabilization, oligomerization and inhibition of the mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor by aurintricarboxylic acid. Eur. J. Biochem. *248*, 30-36.
— Padhmanabhan, S., González, C., Jiménez, M.A., Sanz, J.M., Giménez-Gallego, G., and Rico, M. (1997). Three-dimensional solution structures and stability of phage 434 CRO protein. Biochemistry *36*, 6424-6436.
— Romão, M.J., Kölln, I., Dias, J.M., Carvalho, A.L., Romero, A., Varela, P.F., Sanz, L., Töpfer-Petersen E., and Calvete, J.J. (1997). Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family. J. Mol. Biol. *274*, 650-660.
— Romero, A., Romão, M.J., Varela, P.F., Kölln, I., Dias, J.M., Carvalho, A.L., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., and Calvete, J.J. (1997). The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. Nature Struc. Biol. *4*, 783-788.
— Romero, A., Varela, P.F., Töpfer-Petersen, E., and Calvete, J.J. (1997). Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of Bovine Seminal Plasma PDC-109, a Protein composed of two fibronectin type II domains. Prot. Struct. Funct. Gen. *28*, 454-456.
— Saenz de Tejada, I., Carceller, F., Fernández, A., Cuevas, B., Orte, L., Giménez-Gallego, G., and Cuevas, P. (1997). kinins are implicated on the hypotensive effect of acidic fibroblast growth factor (aFGF). Eur. J. Med. Res. *2*, 302-304.
— Sanz, J.M., and Giménez-Gallego, G. (1997). A partly folded state of acidic fibroblast growth factor at low pH. Eur. J. Biochem. *246*, 328-335.
— Varela, P.F., Romero, A., Sanz, L., Romão, M.J., Töpfer-Petersen, E., and Calvete, J.J. (1997). The 2.4Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. J. Mol. Biol. *274*, 635-649.
— Cuevas, P., Carceller, F. Nieto, I., and Giménez-Gallego, G. (1998). Spasmolytic effect of acidic fibroblast growth factor in early cerebral vasospasm in the rat. Surg. Neurol. *49*, 176-180.
— Cuevas, P., Carceller, F., Muñoz-Willery, I., and Giménez-Gallego, G. (1998). Intravenous fibroblast growth factor penetrates the blood-brain barrier and protects hippocampal neurons against ischemia-reperfusion injury. Surg. Neurol. *49*, 77-84.
— Cuevas, P., Carceller, F., Redondo-Horcajo, M., Lozano, R.M., and Giménez-Gallego, G. (1998). Sistemic administration of acidic fibroblast growth factor ameliorates the icschemic injury of the retina in rats. Neurosc. Lett. *255*, 1-4.
— Cuevas, P., Carceller, F., Reimers, D., and Giménez-Gallego, G. (1998). Acidic fibroblast growth factor rescues gerbil hippocampal neurons from ischemic apoptotic death. Neurol Res. *20*, 271-274.
— Lozano, R.M., Jiménez, M.A., Santoro, J., Rico, M., and Giménez-Gallego, G. (1998). Solution structure of acidic fibroblast growth factor bound to 1,3,6-naphthalene trisulfonate: a minimal model for the anti-tumoral action of suramins and suradistas. J. Mol. Biol. *281*, 899-915.
— Medrano, F.J., Alonso, J., García, J.L., Romero, A., Bode, W., and Gomis-Rüth, F.X. (1998). Structure of proline iminopeptidase from *Xanthomonas campestris* pv. citri: a prototype for the prolyl oligopeptidase family. EMBO J. *17*, 1-9.
— Romero, A., De la Cerda, B., Varela, P.F., Navarro, J.A., Hervás, M., and De la Rosa, M.A. (1998). The 2.15 Å Crystal Structure of a Triple Mutant Plastocyanin from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. J. Mol. Biol. *275*, 327-336.
— Soloaga, A., Ramírez, J.M., Goñi, F.M. (1998). Reversible denaturation, self-aggregation, and membrane activity of *Escherichia coli* -hemoglobin, a protein stable in 6M urea. Biochemistry *37*, 6387-6343.
— Solís, D., Romero, A., Jiménez, M., Díaz-Mauriño, T., and Calvete, J.J. (1998). Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. FEBS Lett. *431*, 273-278.
— Xiaobing, F., Cuevas, P., Giménez-Gallego, G., Yaping, W., and Zhiyong, S. (1998). The effects of fibroblast gorwth factors on ischemic kidney, liver and gut injuries. Chinese Med. J. *111*, 398-403.

Biología Molecular de Bacterias Gram-positivas
Molecular Biology of Gram-positive Bacteria



Paloma López García
Jefa de Grupo / *Group Leader*
Investigadora de Carrera / *Staff Scientist*

Djamel Drider
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

Mónica Amblar Esteban
Nieves García Quintáns
Mauricio Martín (1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Mª Angeles Corrales González
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Bacterias lácticas, utilización de citrato, DNA polimerasas, exonucleasas 5´-3´.

Keywords: Lactic acid bacteria, citrate utilization, DNA polymerases, 5´-3´ exonucleases

I. Sistemas de utilización de citrato de bacterias lácticas

El citrato es utilizado por un numero limitado de bacterias lácticas. Este metabolismo conlleva la producción de diacetilo, cuya secreción contribuye al aroma y sabor de productos lácteos como mantequillas y quesos. Nuestro grupo está caracterizando la utilización de citrato por *Lactococcus lactis biovar diacetylactis* y *Leuconostoc paramesenteroides*.

1. Sistema de transporte de citrato de *L. diacetylactis*. Este sistema está codificado por el operón *citQRP*. La proteína CitP codificada por el gen *citP* es requerida para el transporte, mientras que los productos de los otros dos genes poseen una función reguladora. La expresión del operón está regulada a nivel post-transcripcional. El mRNA *cit* es sometido a procesamiento en una estructura compleja en *L. diacetylactis* y *Escherichia coli*. El análisis de este procesamiento en mutantes de *E. coli* deficientes en ribonucleasas indica que endori-

I.-Systems of citrate utilization in lactic acid bacteria

Citrate is utilized by a limited number of lactic acid bacteria. Diacetyl is produced during citrate metabolism and is responsible for the aroma and flavour of dairy products such as butter and cheese. Our group is characterizing the utilization of citrate by Lactococcus lactis biovar diacetylactis *and* Leuconostoc paramesenteroides.

1. Citrate transport system in L. diacetylactis. *This system is encoded by the citQRP operon. The CitP permease, encoded by citP gene, is required for citrate transport, whereas the products of the two other genes have a regulatory function. The expression of the operon is regulated at the post-transcriptional level. The cit mRNA is processed at a complex secondary structure in* L. diacetylactis *and* Escherichia coli. *Analysis of this processing in E. coli mutants deficient in endoribonucleases indicates that RNase III and RNase E are involved in this process.*

bonucleasas del tipo RNasa III y RNase E están implicadas en este proceso.

A pH ácido, condiciones en las que CitP posee su óptimo de actividad, se induce la transcripción del operón y se elevan los niveles de la permeasa. Hemos mostrado que esta respuesta adaptativa al estrés ácido conlleva un eficiente cometabolismo de citrato y azúcares a pH ácido y parece dotar a *Lactococcus* de una mayor capacidad de supervivencia durante las fermentaciones lácticas.

2. Utilización de citrato por *Lc. paramesenteroides*. Esta línea se ha iniciado en 1998 y pretende un análisis a nivel fisiológico y molecular de los mecanismos de regulación de las dos primeras etapas de la utilización de citrato (transporte y conversión en acetato y oxalacetato) en estirpes de *Lc. paramesenteroides* aisladas de quesos. Se han clonado y secuenciado los genes codificantes de la citrato permeasa y la citrato liasa. Datos preliminares indican que la expresión de ambas enzimas es inducida por citrato. Así, parece que nos encontramos ante un sistema de interés biotecnológico, cuya manipulación genética podría permitir establecer sistemas de expresión activables por citrato, que es un componente de la leche y que está presente en los quesos.

II. Caracterización de la DNA polimerasa I de *Streptococcus pneumoniae*

Las DNA polimerasas del tipo I están implicadas en procesos de replicación y reparación de DNA y son utilizadas en técnicas de manipulación de DNA. La DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* (Spn PolI) posee actividades polimerásica y exonucleásica 5´-3´. Nuestro grupo está realizando un análisis mutacional del centro activo exonucleolítico de Spn PolI. La mutagénesis dirigida del gen *polA*, junto con la sobreproducción, purificación y análisis bioquímico de las versiones modificadas de Spn PolI han permitido obtener y caracterizar Spn PolID10A. Este mutante carece de actividad exonucleásica y puede ser utilizado en técnicas de secuenciación de DNA. Asimismo, nuestros resultados indican que los residuos Asp^{10} y Asp^{190} (conservados en polimerasas del tipo I y en exonucleasas 5´-3´ de bacteriófagos) están localizados en el

The expression of the operon is induced by acidic pH at the transcriptional level. This induction results in high levels of CitP in physiological conditions optimal for its activity. Analysis of this induction reveals that this adaptative response to acidic stress results in alkalinization of the growth medium and is designed to increase survival of Lactococcus *during dairy fermentations by efficient co-metabolism of citrate and sugars at acidic pH.*

2. *Citrate utilization in* Lc. paramesenteroides. *This line of research has been started in 1998 and its aim is a physiological and molecular analysis of the regulatory mechanisms involved in the two first steps of citrate utilization (transport and conversion of citrate in acetate and oxaloacetate) in* Lc. paramesenteroides *strains isolated from cheese. The genes encoding the citrate permease and citrate lyase have been cloned and sequenced. Preliminary data indicate that expression of both enzymes are induced by citrate. Thus, we are analyzing a system of industrial interesting, whose genetic manipulation could allow to establish expression systems inducible by citrate, that is a natural component of milk and is present in cheese.*

II.-Characterization of the DNA polymerase I of Streptococcus pneumoniae

The type I DNA polymerases are involved in DNA replication and repair and they are utilized in DNA manipulation techniques. The S. pneumoniae *DNA polymerase I (Spn PolI) possesses 5´-3´ exonuclease and polymerase activities. Our group is performing a mutational analysis of the exonucleolytic active center of Spn PolI. Site directed mutagenesis of the polA gene as well as overproduction, purification and biochemical analysis of modified versions of Spn PolI have allowed to obtain and characterize Spn PolID10A. This mutant lacks 5´-3´exonucleolytic activity and it can be utilized for DNA sequencing techniques. Moreover, our results indicate that* Asp^{10} *and* Asp^{190} *residues (conserved among the type I polymerases and the 5´-3´exonucleases from bacteriophages) are localized in the exonucleolytic active center and involved in its coordination to metal ions. The* Asp^{10} *seems to have a direct role in catalysis and is not involved in binding to DNA, whereas* Asp^{190} *seems to be implicated in the formation of an stable protein-DNA complex active in catalysis.*

centro activo exonucleolítico e implicados en la coordinación de metales a dicho centro. El residuo Asp^{10} tendría una función directa en la catálisis y no estaría implicado en la unión a DNA. El residuo Asp^{190} estaría implicado en la formación de un complejo estable proteína-DNA catalíticamente activo.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 06G/002/96 (1997-1999).
— CAM, 08.3/0028/1998 (1998-2000).
— CICYT, BIO95-0795 (1995-1997).
— CICYT, BIO96-2462-CE (1996-1998).
— MEC, HP96-43 (1997).
— MEC, HP97-41 (1998).
— UE, BIO4-CT98-0424 (1998-2000).
— UE, ERBCH.CT94/0016 (1995-1997).

Patentes/*Patents*

— M. Amblar, M., Díaz, A. y López, P. (1997). Mejoras introducidas en la patente principal nº 9000542 por Procedimiento de obtención del fragmento carboxilo-terminal de la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae*. Pat. española Num. 9601205. CSIC. España.

Publicaciones/*Publications*

Articulos en Revistas/*Journal Articles*

— Santos, J.M., Drider, D., Marujo, P.E., López, P., and Arraiano, C. M. (1997). Determinant role of *Escherichia coli* RNase III in the decay of both specific and heterologous mRNA. FEMS Microbiol. Lett. *157*, 31-38.
— Amblar, M., and López, P. (1998). Purification and properties of the 5'-3' exonuclease D190A mutant of DNA polymerase I from *Streptococcus pneumoniae*. Eur. J. Biochem. *252*, 124-132.
— Amblar, M., and López, P. (1998). Purification and properties of the 5'-3'exonuclease D10A mutant of DNA polymerase I from *Streptococcus pneumoniae*: a new tool for DNA sequencing. J. Biotech. *63*, 17-27.
— Drider, D., Santos, J.M., Arraiano, C.M., and López, P. (1998). RNA processing is involved in the post-transcriptional control of *citQRP* operon from *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. Mol. Gen. Genet. *258*, 9-15.
— García-Quintáns, C. Magni, D., de Mendoza, D., and López, P. (1998). The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. Appl. Environ. Microbiol. *64*, 850-857.
— López, P., Drider, M., García-Quintans, N., Corrales, M.A., Magni, C., Martin, M., and de Mendoza, D. (1998). Regulation of expression of the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* citrate transport system. Lait *78*, 11-16.
— Dricler, 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 *dialecty lactis* FEMS Microbiol. Lett. *172*, 115-122.

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*

Octavio Miguel Rivero Lezcano (Hasta VI-1998)
Becario Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

Enrique Álvarez Fortes (Hasta VI-1998)
Pilar Díaz-Achirica (Hasta IV-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Marta Berrocal Lobo (Hasta XII-1997)
Juan Luque Ortega (Desde VII-1997)
Pregraduados / *Undergraduate Students*

Palabras clave: *Leishmania*, péptidos antibióticos, diseño de péptidos, interacción péptido-membrana, metabolismo energético.

Keywords: Leishmania, *antibiotic peptides, peptide design, peptide-membrane interaction, bioenergetics.*

I. Diseño de péptidos con acción leishmanicida

Los péptidos eucarióticos antibióticos activos en membrana constituyen una nueva alternativa para los procesos infecciosos. Nuestro grupo se ha centrado en:

1. Mecanismo de acción del péptido sintético híbrido CA(1-8)M(1-18) sobre promastigotes de *Leishmania donovani*. El péptido permeabiliza la membrana plasmática del parásito, con colapso del potencial y disminución de los niveles de ATP, sin afectar la mitocondria. De los componentes de membrana, el lipidofosfoglicano actúa como mecanismo defensivo, mientras que ni la metaloproteinasa de membrana, ni la glucoproteína P, responsable de multirresistencia a fármacos, inducen incremento de resistencia. El péptido sinergiza con ketoconazol y lovastatina, por modificación de la naturaleza y el nivel de esteroles en la membrana del parásito.

2. Acción de CA(1-8)M(1-18) sobre macrófagos.- El amastigote es la forma intracelular y responsable de la patología del parásito en vertebrados. CA(1-8)M(1-18) es poco activo sobre amastigotes aislados, aunque los elimina en el interior del macrófago por producción de NO, con inducción de iNOS e

I. Design of leishmanicidal peptides

Membrane active eukaryotic antibiotic peptides are a new alternative in the treatment of infections. Our work was focused on:

1. Mechanism of action of CA(1-8)M(1-18) on Leishmania *promastigotes. The peptide was active on* Leishmania *at micromolar concentrations, acting through permeabilization of its plasma membrane, dissipation of ionic gradients, collapse of membrane potential and drop in intracellular ATP levels. There was not effect on mitochondria, despite the uncoupling effect induced by the peptide on isolated rat liver mitochondria. Lipophosphoglycan, the most abundant membrane component in the promastigote inhibited lethal activity of the peptide, but other membrane components, such as the abundant metalloproteinase and P glycoprotein, responsible for multidrug resistance, did not protect at all the parasite. Peptide activity was enhanced when the levels or nature of sterols were modified by treatment with ketoconazol or lovastatin.*

2. Macrophage activation by CA(1-8)M(1-18).- Amastigote is the intracellular form of Leishmania, *and responsible for pathology in vertebrates; whereas it was much less susceptible than*

intervención de elementos NF-κB (colaboración con Dr. L. Boscá, I. Bioquímica, CSIC). La producción de NO por CA(1-8)M(1-18) es aditiva con la inducida por IFN- γ y TNF-α, pero no ocurre en presencia de IL-10 o IL-13. El acomplejamiento del péptido con fosfolípidos incrementa la producción de NO y disminuye su toxicidad para el macrófago. En ratones infectados con *L. major*, la aplicación de CA(1-8)M(1-18) sobre la úlcera induce la curación del animal.

3. Búsqueda de péptidos leishmanicidas más activos En colaboración con el Dr. D. Andreu (U. Central Barcelona), se han desarrollado péptidos de tan sólo 11 aminoácidos activos a concentraciones submicromolares sobre *Leishmania*. Se han ensayado otros grupos de péptidos tales como androctonina, temporina, siringotoxina, y diastereoisómeros de melitina, y en colaboración con el Prof. García-Olmedo, ETSIA, Madrid, otros de origen vegetal, de los cuales las tioninas de trigo han resultado los péptidos leishmanicidas más eficaces. Se ha comenzado el análisis de los péptidos inducidos en el flebotomo, el díptero vector de *Leishmania*, por infección con el parásito.

4. Desarrollo de métodos de ensayo de fármacos que actúan sobre los niveles de ATP del parásito. Utilizando parásitos transfectados con el gen de la luciferasa, dirigida tanto al glucosoma como al citoplasma, se ha desarrollado métodos rápidos de ensayo para fármacos que modifican los niveles de ATP del parásito y se ha demostrado la existencia de translocadores de ATP en el glucosoma.

II. Metabolismo energético de *Leishmania*

Los tripanosomátidos presentan una plasticidad muy elevada en su metabolismo energético. La transfección de parásitos con el gen de la proteína desacoplante 1 mitocondrial (UCP1) de hámster con mutaciones que anulan su inhibición por GDP es letal para el parásito (colaboración con E. Rial y F. Bouillaud) ya que la glucolisis es incapaz de suplir las demandas energéticas del promastigote, conforme al análisis de sus metabolitos por RMN (colaboración con el Dr. Cerdán, I. Biomédicas, CSIC), que demuestra que la fosforilación oxidativa es esencial en *Leishmania*, en contraposición a otros tripanosomátidos.

the promastigote to the peptide in vitro, *when parasitized macrophages were treated with CA(1-8)M(1-18), it induced macrophage activation and amastigotes were killed by NO production with induction of iNOS expression involving NF-κB factors (collaboration with Dr. L. Boscá, (I. Bioquímica, CSIC, Madrid). NO production caused by the peptide synergized with IFN-γ and TNF-α, but did not overcome anergy induced by IL-10 or IL-13. Peptide-phospholipid complex increased NO production and reduced toxic effect on the macrophage. Topical treatment of the ulcers on* L. major *infected mice with CA(1-8)M(1-18) caused animal healing.*

3. Development of better leishmanicidal peptides.- In collaboration with Dr. D. Andreu (University of Barcelona), leishmanicidal peptides with only 11 residues, active at sumbicromolar concentrations were developed. Furthermore, other peptides, such as androctonin, temporins, syringotoxins and melittin diastereoisomers were also assayed; in collaboration with Prof. García–Olmedo (ETSIA, Madrid), we tested several plant antibiotic peptides; wheat thionins turned out to be the most active leishmanicidal peptides. Specific Leishmania*-induced antibiotic peptides in the sandfly, its invertebrate vector, were identified.*

4. Development of fast assay methods for leishmanicidal peptides.- Transfection of Leishmania *with two forms of luciferase gene, targeted either to the glucosome or to the cytoplasm allowed a time- and material saving assay method for drugs affecting ATP levels, as well as evidence for an adenine nucleotide carrier in the glucosome.*

II. Energetic metabolism in Leishmania

Energetic metabolism in Leishmania *is the target for many leishmanicidal drugs. Promastigote expression of UCP1 mutants lacking inhibition by GDP was lethal for* Leishmania *(collaboration with Dr. E. Rial and F. Bouillaud). As measured by NMR (Dr. S. Cerdán, I. Biomédicas, CSIC), glycolysis was unable to cope with energetic requirements of the parasite, evidencing that oxidative phosphorylation is essential for* Leishmania *in contrast to other trypanosomatids.*

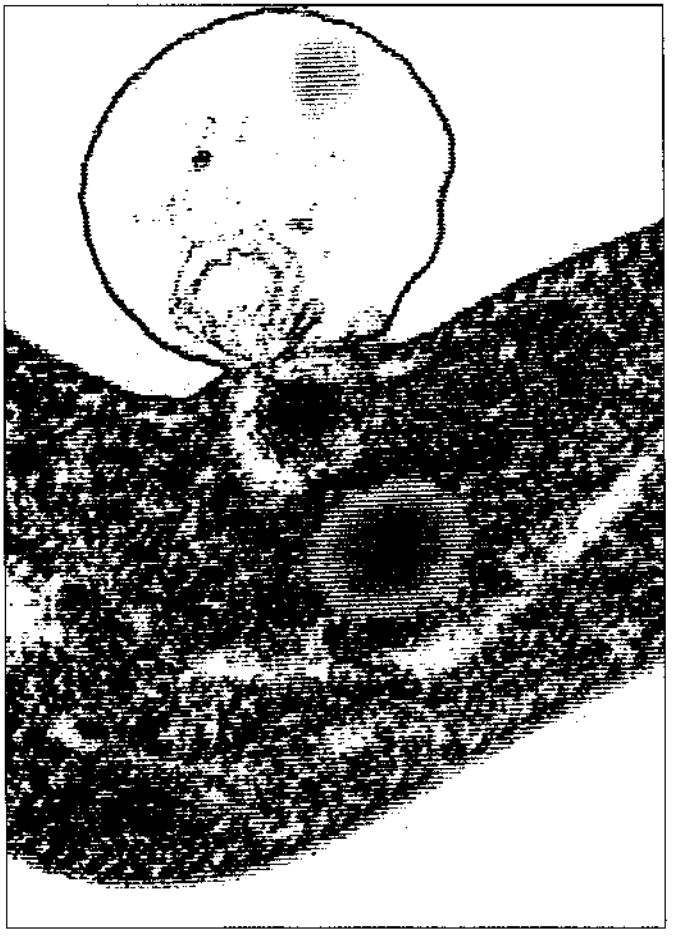


Figura: Lesiones producidas en promastigotes de *Leishmania* por el péptido híbrido cecropina A-melitina CA(1-8)M(1-18) 2 μM

Figure: Membrane lesions induced by the cecropin A-melittin hybrid peptide CA(1-8)M(1-18) at 2 μM on Leishmania *promastigotes*

Figura: Promastigotes de *L. major* transfectados con el gen *ucp*1. Expresión de la proteína en mitocondria y kinetoplasto mediante antisuero policlonal.

Figure: L. major promastigotes transfected with *ucp*1. Mitochondrial expression as identified by rabbit polyclonal antiserum.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CICYT, SAF95-0019 (1995-1997).

— UE, IC18-CT97-0213 (1998-2000).

Tesinas de Licenciatura/*Master Theses*

— **Marta Berrocal Lobo.** Péptidos vegetales antibióticos con acción leishmanicida. Universidad Complutense de Madrid, 1998. Director: L. Rivas López.

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Pilar Díaz-Achirica.** Péptidos híbridos Cecropina A-melitina con acción leishmanicida. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Director: L. Rivas López.

— **Enrique Álvarez Fortes.** Expresión y funcionalidad de la proteína desacoplante I en promastigotes de *Leishmania major*. Universidad Complutense de Madrid, 1998. Director: L. Rivas López

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Fresno, M., Kopf, M., and Rivas, L. (1997). Cytokines in infectious diseases. Immunol. Today. *18*, 56-58.

— Rivero-Lezcano, O.M., Chicharro, C., and Rivas, L. (1997). Acidic pH stress induces protein tyrosine phosphorylation in *Leishmania pifanoi*. Mol. Biochem. Parasitol. *84*,123-127.

— Velasco, M., Díaz-Guerra, M.J.M., Díaz-Achirica, P., Andreu, D., Rivas, L., and Boscá, L. (1997). Induction of nitric oxide synthase and apoptosis in RAW cells by cecropinA-melittin hybrid peptide CA(1-8)M(1-18). J. Immunol. *258*, 4437-4443.

— Álvarez-Fortes, E., Ruiz-Pérez, L.M., Bouillaud, F., Rial, E., and Rivas, L. (1998). Expression and regulation of mitochondrial uncoupling protein I from brown adipose tissue in *Leishmania major* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. *93*,191-202

— Díaz-Achirica, P., Guinea, A., Ubach, J., Andreu, D., and Rivas, L. (1998). The plasma membrane from *Leishmania donovani* promastigotes is the main target fror CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid. Biochem. J. *330*, 453-460.

— Haberer, J.E., Da-Cruz, A.M., Soong, L., Oliveira-Neto, M.P., Rivas, L., McMahon-Pratt, D., and Coutinho, S. (1998). Mapping of the *Leishmania pifanoi* amastigote antigen P-4 epitopes involved in T-cell responsiveness to human cutaneous Leishmaniasis. Infect. Immun. *66*, 3100-3105.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Andreu, D., and Rivas, L. (1997). Péptidos antibióticos eucarióticos. In Nuevas tendencias en péptidos en Biología y Biomedicina. D. Andreu and L. Rivas, eds. (Madrid: CSIC) pp 373-406.

— Rivas, L., and Rivero-Lezcano, O.M. (1997). Peptidotecas en fagos filamentosos. In Nuevas tendencias en péptidos en Biología y Biomedicina. D. Andreu y L. Rivas, eds. (Madrid: CSIC) pp 251-293

— Rivas, L., Velasco, M., Díaz-Guerra, J.M., Díaz-Achirica, P, Andreu, D., and Boscá, L. (1998). CA(1-8)M(1-18) a Cecropin A-Melittin hybrid peptide, induces nitric oxide, apoptosis and leishmanicidal activity in macrophages. In Peptides 1996, R. Ramage and R. Epton, eds. (Kingswinford:MayflowersScientific Ltd) pp 755-756.

Las Proteínas de División Celular FtsZ y Tubulina como Máquinas Moleculares de Ensamblaje y Dianas de Citostáticos

Tubulin and FtsZ as Protein Assembly Machines and Cytostatic Targets

José M. Andreu Morales
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Rosario Gil Alvárez (Hasta VII-1997)
Investigadora Emérito / *Emeritus Scientist*

J. Fernando Díaz Pereira
M. Graciela Pucciarelli Morrone (Hasta VI-1998)
Investigadores Contratados / Research *Associates*

Lucia Arregui García-Royés
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

Pablo Chacón Montes
Juan A. Evangelio Palomo
Silvia Zorrilla López (Desde X-1998)
Becarios Predoctorales / Graduate Students

Rosa Martínez-Dalmau
Personal Técnico / *Technician*

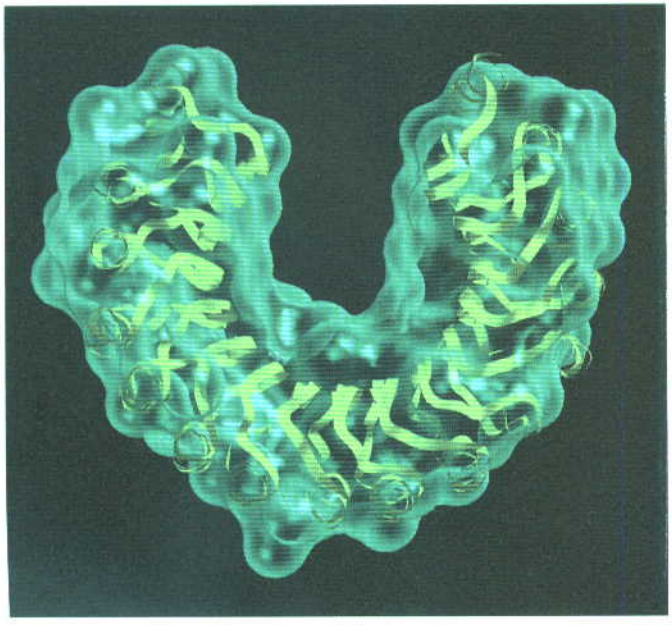


Figura: La figura ilustra una prueba de un nuevo método basado en un algoritmo genético para modelar la estructura a baja resolución de proteínas directamente a partir de dispersión de rayos X en solución. El perfil de dispersión del inhibidor pancreático de ribonucleasa se calculó hasta un espaciado recíproco de 17 Å a partir de la estructura cristalográfica (PDB 1bnh; Kobe & Deisenhofer, 1993), representada por el diagrama de cintas amarillo. A continuación se empleó el método para buscar posibles modelos que reproducen el perfil de dispersión. Todos ellos son semejantes y describen el tamaño y forma de la estructura problema a la resolución del modelado. Uno de los modelos (formado por 147 esferas de radio 4 Å) se muestra por la superficie azul superpuesta (Chacón et al., 1998).

Figure: The figure illustrates a test of a new genetic algorithm modeling method. The low resolution structure of pancreatic ribonuclease inhibitor has been directly modeled from small angle X-ray solution scattering. The solution scattering profile was calculated to a reciprocal spacing of 17 Å from the crystallographic structure (PDB 1bnh; Kobe & Deisenhofer, 1993), which is shown in yellow ribbon representation. The method was then employed to find possible bead models which fit the scattering profile. These were all similar, and reproduced the size and shape of the problem structure to the modeling resolution. One model (made of 147 beads of radius 4 Å) is shown by the blue surface (Chacón et al., 1998).

Palabras clave: FtsZ, tubulina, microtúbulos, taxol, SAXS, algoritmos genéticos.

Tubulina ensambla formando los microtúbulos, constituyentes principales del huso mitótico que segrega los cromosomas durante la división celular eucariótica. FtsZ es una proteína esencial para la división procariótica, que se localiza en el anillo de septación entre las bacterias hijas. Mientras que tubulina es el blanco de acción de drogas antitumorales como taxol y nuevas substancias que suprimen la dinámica de los microtúbulos del huso e inducen apoptosis, desconocemos posibles antibióticos que uniendose a FtsZ bloqueen especificamente la división bacteriana. Nuestro laboratorio se interesa por las interacciones funcionales de tubulina y FtsZ, para cuyo estudio utilizamos una variedad de abordajes y desarrollamos nuevos métodos.

Estructura-función de las proteínas homólogas tubulina y FtsZ

Estas GTPasas atípicas se activan como consecuencia de su ensamblaje. Los microtúbulos son polimeros pseudohelicoidales cilíndricos (~24 nm) constituidos típicamente por 13 protofilamentos longitudinales. Cada protofilamento está formado por la asociación cabeza-cola de dímeros de αβ-tubulina. El GTP-Mg^{2+} no hidrolizable unido a la subunidad α controla la estabilidad del dimero y se localiza bioquimicamente en la interfase de dimerización (1), mientras que el GTP hidrolizable unido a la subunidad β, que regula la estabilidad del microtúbulo (la funcionalidad del dímero), se localiza en el extremo positivo de polimerización del dímero de tubulina.

Aunque la identidad de secuencia entre las familias de FtsZ y tubulina es baja, excepto en motivos como el de unión de nucleotido GGGTG(TS)G, pudimos detectar extensas zonas homólogas mediante análisis predictivo de estructura secundaria contrastado con la determinación bioquímica de secuencias de superficie (de Pereda et al., Biochemistry 35, 14203-14215, 1996). De hecho, la estructura modelo del dímero de αβ–tubulina obtenida mediante cristalografía de electrones por Nogales, Wolf & Downing, (Nature 391, 199-203, 1998) y la estructura de FtsZ de la arqueobacteria termófila *Methanococcus jannaschii,*

Keywords: FtsZ, tubulin, microtubules, taxol, SAXS, genetic algorithms

Tubulin assembles into microtubules, the main constituents of the mitotic spindle which segregates the chromosomes in eukaryotic cell division. FtsZ is an essential prokaryotic cell division protein, which localizes to the septation ring between daughter bacterial cells. Tubulin is the target of antitumour drugs such as taxol and new substances which suppress spindle microtubule dynamics and induce apoptosis. However, possible antibiotics which may block bacterial cell division by binding to FtsZ are presently unknown. Our laboratory focuses on the functional interactions of tubulin and FtsZ, including a variety of experimental approaches and the design of new methods.

Structure & function of homologous proteins tubulin and FtsZ

These are atypical GTPases, which become activated to hydrolyze GTP as a result of the intermolecular contacts during assembly. The microtubules are pseudohelical cylindrical polymers (~24 nm) typically made of 13 longitudinal protofilaments. Each of these is formed by the head to tail association of αβ-tubulin dimers. Non-hydrolizable GTP-Mg^{2+} bound to αβ-tubulin controls dimer stability and has been biochemically located at the dimerization interface (1), whereas the hydrolyzable GTP bound to β-tubulin regulates microtubule stability (ie., the function of the tubulin dimer) and locates to the polymerization plus-end of the tubulin dimer.

Sequence identity between the FtsZ and tubulin families is low, except in local motifs such as their characteristic nucleotide binding sequence GGGTG(TS)G. We detected large homologous zones by means of secondary structure predictions and biochemical mapping of surface sequences (de Pereda et al., Biochemistry 35, 14203-14215, 1996). The model structure of the αβ-tubulin dimer obtained by electron crystallography by Nogales, Wolff & Downing (Nature 391, 199-203, 1998) and the X-ray crystal structure of FtsZ from the thermophilic archaeon Methanococcus jannaschii, *determined by Löwe & Amos (Nature 391 203-206,*

determinada mediante cristalografía de rayos X por Löwe & Amos (Nature 391 203-206, 1998) tienen esquemas de plegamiento idénticos. Sin embargo, el dominio C-terminal de tubulina, por el que interaccionan los microtúbulos con las proteínas motoras y proteínas asociadas, esta ausente en FtsZ. Este dominio consta de dos largas hélices y el extremo acídico de la cadena peptídica que se pierde de la estructura cristalográfica. Péptidos recombinantes de α y β-tubulina pueden formar la helice C-terminal en solución, manteniendo el extremo desordenado, según se observa mediante CD y NMR (2). FtsZ constituye un sistema modelo mas fácilmente accesible a ingeniería de proteínas, que utilizamos para investigar problemas clave en el ensamblaje de ambas proteínas.

Mecanismos de reconocimiento molecular de taxoides por microtúbulos

Taxol induce el ensamblaje de tubulina purificada y estabiliza los microtúbulos. Los microtúbulos ensamblados con taxol tienen de media un protofilamento menos que con su análogo docetaxel y que los microtúbulos control. Taxol y docetaxel se unen e intercambian facilmente en microtúbulos pre-ensamblados, provocando los cambios correspondientes en el número de protofilamentos, observados en 0.5~1 minuto mediante dispersión de rayos X de sincrotrón y criomicroscopía electrónica, lo que sugiere la existencia de dinámica interna en los microtúbulos (3).

Los taxoides fluorescentes activos como Flutax (7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]taxol) constituyen sondas especificas que modifican sus propiedades espectroscopicas al unirse rápidamente al sitio de taxol en los microtúbulos. La fluoresceína permanece movil, de acuerdo con medidas de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal. La interpretación mas sencilla de nuestros resultados es que taxol se une en la superficie externa de lo microtúbulos (4). Por el contrario, si se uniera en el lumen, de acuerdo con la posición asignada en el dímero de tubulina (Nogales et al., 1998), estos resultados indicarian que el lumen de los microtúbulos es un nuevo compartimento funcional sorprendentemente accesible desde el exterior (3,4). Para distinguir entre ambas posibilidades y conocer el mecanis-

1998) have identical folding patterns. Microtubules interact with motor proteins and associated proteins through the C-terminal domain of tubulin, which is absent from FtsZ. This domain contains two long helices and the acidic end of the polypeptide chain, which is lost from the crystal structure. Recombinant α and β-tubulin peptides can form the C-terminal helix in solution, whereas the acidic end remains disordered, as observed by CD and NMR (2). FtsZ is a model system more amenable to protein engineering, which we are employing to investigate key problems in the assembly of both proteins.

Mechanisms of molecular recognition of taxol by microtubules

Taxol induces assembly of purified tubulin and stabilizes microtubules. Taxol assembled microtubules have on average one protofilament less than microtubules assembled with the analogue docetaxel and control microtubules. Taxol and docetaxel bind and exchange easily on preassembled microtubules, inducing the corresponding protofilament number changes in 0.5 -1 min, observed with synchrotron X-ray scattering and cryoelectron microscopy.This suggests the existence of internal microtubule dynamics (3).

Active fluorescent taxoids such as Flutax (7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl]taxol) are specific probes which change their spectroscopic properties when they rapidly bind to the taxol binding site of microtubules. The fluorescein moiety remains considerably mobile as indicated by time-resolved fluorescence anisotropy measurements. The simplest interpretation of our results is that the taxol binding site is at the outer microtubule surface (4). On the contrary, if taxol binds at the microtubule lumen according to its position in the tubulin dimer model structure (Nogales at al., 1998), our results would indicate that the microtubule lumen is a new, surprisingly accessible functional compartment (3,4). In order to distinguish between both possibilities and to determine the mechanisms of interaction of taxol with microtubules, the fast binding and dissociation kinetics of fluorescent taxoids are being measured.

mo de interacción de taxol con los microtúbulos estamos midiendo la cinética rápida de unión y disociación de taxoides fluorescentes.

Dispersión de rayos X y biocomputación

Se ha desarrollado un método de análisis de dispersión de rayos X (SAXS) basado en algoritmos genéticos, que permite deducir numéricamente estructuras modelo convergentes que reproducen el perfil de dispersión. El método explora eficientemente el espacio configuracional haciendo evolucionar los mejores modelos, en lugar de intentar calcular el perfil de SAXS para todas las posibles distribuciones de masa. Dichos modelos reproducen fielmente la forma y dimensiones de proteínas de estructura cristalográfica conocida (vease Figura) (5). Aplicando estos procedimientos nos proponemos caracterizar los cambios estructurales de tubulina al ensamblador en microtúbulos. El objetivo general consiste en poder extraer la estructura de proteínas en solución a 2 nm de resolución de sus perfiles de SAXS experimentales, de forma complementaria a microscopía electrónica y los métodos de alta resolución.

1) Menéndez, M. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 167-176.
2) Jiménez, M.A. et al. (1998) Prot. Sci.
3) Diaz, J.F. et al. (1998) J. Biol. Chem, 273, 33803-338110.
4) Evangelio,J.A. et al. (1998) Cell Motil. Cytoskeleton, 39, 73-90 & cover.
5) Chacón, P. et al. (1998) Biophys. J. 74, 2760-2775 & cover.

X-ray solution scattering and biocomputing

A new method has been devised to analyze small angle X-ray scattering (SAXS) based on genetic algorithms, which numerically retrieves convergent bead model structures reproducing the scattering profile. This method efficiently searches the configurational space and evolves best-fit models, instead of attempting to compute the SAXS profile for all possible mass distributions. The models faithfully reproduce the dimensions and shape of problem protein structures (see Figure) (5). We intend to characterize the structural changes of tubulin upon assembly with these methods. The goal of such approach is to extract the solution structure of proteins to 2 nm resolution from their experimental SAXS profiles, which is complementary to electron microscopy and the high resolution methods.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*
— DGES, PB95-0116 (1996-1999).
— Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (1996-1998).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Abril, A., Salas, M., Andreu, J.M., Hermoso, J.M., and Rivas, G. (1997). Phage 29 protein p6 is in a monomer-dimer equilibrium that shifts to higher association states at the millimolar concentrations found *in vivo*. Biochemistry *36*, 11901-11900.

— Acebo, P., García de Lacoba, M., Rivas, G., Andreu, J.M., Espinosa, M., and del Solar, G. (1998). Structural features of the plasmid pMV-158-encoded transcriptional repressor CopG, a protein sharing similarities with both helix-turn-helix and β-sheet DNA-binding proteins. Proteins *32*, 248-261 & cover.

— Andreu, J.M., Pérez-Ramírez, B. Gorbunoff, M.J., Ayala, D., and Timasheff, S.N. (1998). The role of the colchicine ring A and its methoxy groups in the binding to tubulin and microtubule inhibition. Biochemistry *37*, 8356 - 8368.

— Barbier, P., Peyrot, V., Leynadier, D., and Andreu, J.M. (1998). The active GTP- and ground GDP-liganded states of tubulin are distinguished by the binding of chiral isomers of ethyl 5-amino-2-methyl-1,2,dihydro-3-phenylpyrido[3,4-*b*]pyrazin-7-yl carbamate. Biochemistry *37*, 758-768.

— Chacón, P., Morán, F., Díaz, J.F., Pantos, E., and Andreu, J.M. (1998). Low resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. Biophysical J. *74*, 2760-2775.

— Díaz, J.F., Strobbe, R., Chacón, P., Andreu, J.M., Diakun, G., and Engelborghs, Y. (1998). Fast mixing device for time-resolved synchrotron X-ray scattering studies of radiation sensitive proteins. Rev. Sci. Instr. *69*, 286-289.

— Díaz, J.F., Valpuesta, J.M., Chacón, P., Diakun, G., and Andreu, J.M. (1998). Changes in microtubule protofilament number induced by taxol binding to an easily accessible site: internal microtubule dynamics? J. Biol. Chem. *273*, 33803-33810

— Encinas, M.V., Evangelio, J.A., Andreu, J.M., Goldie, H., and Cardemil, E. (1998). Urea-induced equilibrium unfolding of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase: evidence of an intermediate and substrate effects. Eur. J. Biochem. *255*, 439-445.

— Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuña, A.U., Amat-Guerri, F., and Andreu, J.M. (1998). Fluorescent taxoids as probes of the microtubule cytoskeleton. Cell Motil. Cytoskeleton *39*, 73-90.

— Giraldo, R., Andreu, J.M., and Díaz-Orejas, R. (1998). Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. EMBO J. *17*, 4511-4526.

— Jiménez-Barbero, J., Souto, A.A., Abal, M., Barasoain, I., Evangelio, J.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., and Amat-Guerri, F. (1998). Effect of 2'-OH acetylation on the bioactivity and conformation of 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyltaxol. A NMR-fluorescence microscopy study. Bioorg. Med. Chem. *6*, 1857-1863.

— Menéndez, M., Rivas, G., Díaz, J.F., and Andreu, J.M. (1998). Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high-affinity magnesium ion at nucleotide N-site J. Biol. Chem. *273*, 167-176.

Parasitología Molecular
Molecular Parasitology

Vicente Larraga Rodríguez de Vera
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Alberto Marqués Espinosa († IX-1998)
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Gloria González Aseguinolaza (Hasta II-1998)
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

M. Jesús Ramiro Ibáñez (Desde VII-1998)
Soraya Taladriz Moreno
Tobias Hanke Schaefer (Desde VI-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida en España por *L.infantum* que ha experimentado un crecimiento importante en Europa y ha sido calificada por la WHO como enfermedad emergente. El desarrollo de una vacuna aparece como una de las formas mas efectivas de lucha frente a la infección. Dentro de la búsqueda de antigenos protectores frente a la

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 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

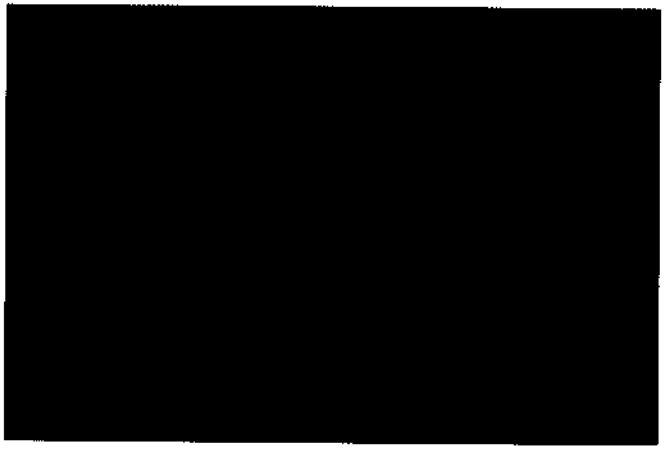


Figura: Análisis mediante inmunofluorescencia de la localización celular de la PKC (en verde) en promastigotes de *Leishmania infantum* activados con PMA (4 phorbol 12-myristate 13 acetate). En tinción DAPI (4', 6-Diamidine –2 phenylindole-dihydrochloride) el núcleo y el kinetoplasto (ambos en azul).

Figure: PKC localization by immunofluorescence in PMA activated Leishmania infantum *promastigotes. PKC (green). Nucleus and kinetoplast (in blue).*

infección, el laboratorio de Parasitología Molecular del CIB ha conseguido clonar, entre otros, el gen de una proteína p36/LACK que ofrece buenos resultados de protección, superiores al 60 por ciento, en el modelo murino usando un virus vaccinia recombinante como vehículo de vacunación. En estos momentos se están llevando a cabo experimentos de protección en el huésped intermediario de la enfermedad, perro, mediante el uso de plásmidos recombinantes que contengan el gen del antígeno protector, así como determinar algunos parámetros básicos de la respuesta del sistema inmune del perro frente al parásito. Por otra parte, dada la posible relación del antígeno protector con los mecanismos de replicación del parásito, se esta procediendo a clonar la DNA polimerasa beta y la Topoisomerasa II de *L.infantum* y se detectará su posible relación con la proteína p36/LACK así como el efecto de moléculas inhibitorias de la actividad de la DNA polimerasa beta y la Topoisomerasa II como posibles agentes antiparasitarios.

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 work in the laboratory is 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 in the response against the experimental infection. Additionally, p36/LACK seems to be related to the parasite replication mechanisms. The possible relation of the protective antigen to the* L.infantum *DNA polymerase beta and Topoisomerase II will be determined and the usefulness as chemotherapy agents of inhibitors of the enzyme activity will be investigated.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— FIS, 97/0492 (1997-1999).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Gloria González-Aseguinolaza** Clonación y caracterización de antígenos del parásito *Leishmania infantum*. Universidad Autónoma de Madrid, 1997. Director V. Larraga.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— González-Aseguinolaza, G., Almazán, F., Rodríguez, J.F., Marquet, A., and Larraga V. (1997). Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. differential post-translational modifications correlated with different infective forms. Biochem. Biophys. Acta *1361*, 92-102.

— González-Aseguinolaza, G., Taladriz, S., Marquet A., and Larraga, V. (1998). Cloning and structural analysis of the gene encoding the ribosomal protein S6 from the parasite *Leishmania infantum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. *248*, 464-468.

— González-Aseguinolaza, G., Taladriz, S., Marquet A., and Larraga, V. (1998). Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania inantum*. Eur. J. Biochem. *259*, 1-8.

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*

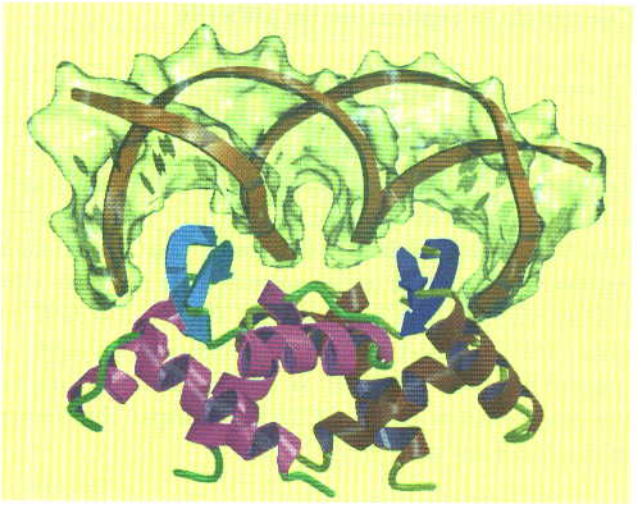
Concepción Nieto Mazarron
Gloria del Solar Dongil
Investigadores Contratados / Research *Associates*

María Dolores Montiel (IX-XI, 1998)
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

Maria Eugenia Farias (Desde XI-1998)
Elisabeth Grohmann (Hasta XII-1997)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Paloma Acebo Pais
Leda Guzman Maluenda (Hasta IV-1997)
Ana Maria Hernández Arriaga
Maria Gabriela Kramer Xavier (Hasta V-1997)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

María Teresa Alda López
Personal Técnico / *Technician*



Estructura tridimensional de CopG acomplejada con su DNA diana
Three-dimensional structure of CopG complexed with its target DNA

Palabras clave: Replicación y control plasmídicos, interacciones DNA-proteínas, control de la expresión génica.

Keywords: Plasmid replication and control, DNA-protein interactions, control of gene expression.

I. Replicación de la hebra líder de pMV158

Este plásmido 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 dinucleótido GpA, el cual está mediado por el residuo Y99, ya que cambios Y99F o Y99S dan lugar a variantes que han perdido su actividad catalítica. Tras este ataque, RepB genera un enlace covalente transitorio ya que se conserva la quiralidad del fosfato implicado en la reacción de corte y cierre. Se ha mapeado *in vitro* el sitio de iniciación de la replicación del plásmido pFX2, y se ha demostrado reacción cruzada entre RepB (pMV158) y RepX (pFX2) y sus respectivos orígenes de

I. Leading strand replication of pMV158

This plasmid replicates by the rolling circle mechanism, and has a high copy number (N=20). Replication initiates by the nucleofilic attack exerted by the initiator RepB protein on the dinucleotide GpA, which is mediated by the Y99 residue of RepB: changes Y99F or Y99S lead to protein variants without catalytic activity. Upon cleavage, RepB generates a transient covalent bond, since the chirality of the phosphate involved in the nicking-closing reaction is kept. We have mapped in vitro *the site where leading strand replication initiates in pFX2, and shown cross-reactivity between RepB (pMV158) and RepX (pFX2) with their cognate origins. The* in vivo *sites of repli-*

replicación. Se han determinado, *in vivo*, los sitios de iniciación de la replicación de pMV158, pFX2 y pE194.

II. Control de la replicación de pMV158

El control de N se ejerce sobre la síntesis de RepB y está mediado por el represor transcripcional CopG y el RNA contratranscrito, RNA II. Se han aislado y caracterizado mutantes en *copG*, y diseñado métodos sencillos para el aislamiento de mutantes de copia. Se ha realizado una caracterización biofísica y de modelado molecular de CopG. Se ha logrado resolver la estructura tridimensional de la proteína, tanto sola como en complejo con su DNA diana. La región que codifica RNA II constituye el principal determinante de incompatibilidad de pMV158, si bien se ha mostrado que ambos componentes, CopG y RNA II participan directamente en el control del valor de N.

III. Síntesis de la cadena retrasada de pMV158

La replicación de la hebra retrasada se inicia en el origen de cadena retrasada, *sso*, seguida de síntesis de DNA y la conversión de ssDNA en dsDNA. pMV158 posee dos *sso*, *ssoA* y *ssoU*. Se ha realizado la caracterización física y funcional del *ssoA*. 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.

IV. Movilización de pMV158

pMV158 es movilizable mediante funciones suministradas por plásmidos conjugativos co-residentes. pMV158 contiene un origen de transferencia (*oriT*), donde la proteína MobM introduce su corte específico. Se ha purificado MobM y se han definido los parámetros óptimos de su actuación sobre DNA de pMV158. MobM se une covalentemente al extremo 5' de su DNA diana, dejando un extremo 3'-OH libre. Se han mapeado *in vivo* los *oriT*s de los plásmidos pUB110 y pE194.

cation initiation of plasmids pMV158, pFX2, and pE194 have been determined.

II. Replication control of pMV158

Copy number control of pMV158 is exerted on synthesis of RepB, and is mediated by two plasmid-encoded components: the transcriptional repressor CopG and the countertranscribed RNA, RNA II. Mutations in copG have been isolated and characterized, and simple methods for isolation of copy number mutants have been developed. We have performed a biophysical characterization and molecular modelling of CopG. The three-dimensional structure of CopG, alone and complexed with its target DNA have been solved. The region encoding RNA II is the main incompatibility determinant of pMV158, but we have shown that both, CopG and RNA II participate directly on the control of the N value.

III. Lagging strand synthesis of pMV158

Lagging strand replication initiates in the single stranded origin, sso, and it involves the conversion of ssDNA molecules into dsDNA forms. pMV158 has two sso, termed ssoA *and* ssoU. *We have performed the physical and functional characterization of the ssoA. ssDNA to dsDNA conversion is mediated by the host-encoded RNA polymerase. We have defined the existence of promoters that act only on single-stranded DNA. We have mapped the RNA primer involved in the lagging strand synthesis.*

IV. Mobilization of pMV158

pMV158 is mobilizable by functions supplied by co-resident conjugative plasmids. pMV158 harbors an origin of transfer (oriT), where the plasmid-encoded MobM protein introduces a specific nick. MobM protein has been purified. Parameters of MobM-cleavage of dsDNA have been defined. After cleavage of its target DNA, MobM remains covalently bound to the 5' end of the DNA, leaving a free 3'-OH end. We have mapped in vivo *the oriTs of plasmids pUB110 and pE194.*

V. El regulón *mal* de *S.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*. 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, lo que apoya la existencia de lazos evolutivos entre estas tres proteínas.

V. The mal regulon of S.pneumoniae

We have purified the transcriptional regulator MalR of S.pneumoniae, *and characterizad the interactions between MalR and its target DNA. Binding of MalR to its target is inactivated by maltose. MalR shows a greater apparent affinity for the* malMP *operator than for the one present in the* malXCD *operon. MalR binds to a palindromic sequence which is also found in two repressor target sequences of* E.coli, *the PurR and (putative) MalI. This result supports the notion of an evolutionary link between this three proteins.*

Organismos Financiadores/Funding Agencies

— CICYT, BIO94-1029 (1994-1997).
— CICYT, BIO97-0347 (1997-2000).
— EU Biotech Concerted Action, BIO4-CT98-0099 (1997-2000).
— MEC-MAE. Acciones Integradas Hispano-Austríacas (1997).
— UE, 937004-AR Coordinado con el Dr. Diego de Mendoza, U. Rosario, Argentina (1995-1997).

Tesinas de Licenciatura/*Master Theses*

— **Ana María Hernández Arriaga.** Funcionalidad de orígenes de cadena retrasada de en la replicación de plásmidos mediante círculo rodante. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Director: G. del Solar.

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Leda Marcela Guzmán Maluenda.** Caracterización de las funciones de movilización del plásmido pMV158. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Director: M. Espinosa.
— **María Gabriela Kramer Xavier.** Orígenes de replicación de la cadena retrasada del plásmido pMV158. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Director: M. Espinosa.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Del Solar, G., Acebo, P., and Espinosa, M. (1997). Replication control of plasmid pLS1: the antisense RNA II and the compact *mall* region are involved in translational regulation of the Initiator RepB synthesis. Mol. Microbiol. *23*, 95-108.
— Grohmann, E., Zechner, E.L., and Espinosa, M. (1997). Determination of specific DNA strand discontinuities with nucleotide resolution in exponentionally growing bacteria harbouring rolling circle-replicating plasmids. FEMS Microbiol. Lett. *152*, 363-369.
— Guzmán, L.M., and Espinosa, M. (1997). The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. J. Mol. Biol. *266*, 688-702.
— Kramer, M.G., Khan, S.A., and Espinosa, M. (1997). Plasmid rolling circle replication: identification of the RNA polymerase-directed primer RNA and requirement of DNA polymerase I for lagging strad initiation. EMBO J. *16*, 5784-5795.
— Moscoso, M., Eritja, R., and Espinosa, M. (1997). Initiation of replication of plasmid pMV158: mechanisms of DNA strand transfer reactions mediated by the initiator RepB protein. J. Mol. Biol. *268*, 840-856.

— Nieto, C., Espinosa, M., and Puyet, A. (1997). The maltose/maltodextrin regulon of *Streptococcus pneumoniae*: Differential promoter regulation by the transcriptional repressor MalR. J. Biol. Chem. *272*, 30860-30865.

— Zechner, E.L., Prüger, H., Grohmann, E., Espinosa, M., and Högenauer, G. (1997). Specific cleavage of chromosomal and plasmid DNA strands in Gram-positive and Gram-negative bacteria can be detected with nucleotide resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *94*, 7435-7440.

— Acebo, P., García de Lacoba, M., Rivas, G., Andreu, J.M., Espinosa, M., and del Solar, G. (1998). Structural features of the plasmid pMV158-encoded transcriptional repressor CopG, a protein sharing similarities with both helix-turn-helix and β-sheet DNA binding proteins. Proteins: structure, function and genetics *32*, 248-261.

— Acebo, P., Hernández-Arriaga, A.M., Kramer, M.G., Espinosa, M., and del Solar, G. (1998). Identification of a new gene in the streptococcal plasmid pLS1: the *rnal* gene. Plasmid *40*, 214-224.

— Del Solar, G., Giraldo, G., Ruiz-Echevarría, M.J., Espinosa, M., and Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol. and Mol. Biol. Rev. *62*, 434-464.

— Gomis-Rüth, F.X., Solá, M., Acebo, P., Párraga, A., Guasch, A., Eritja, R., González, A., Espinosa, M., del Solar, G., and Coll, M. (1998). The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG, unliganded and in complex with its operator. EMBO J. *17*, 7404-7415.

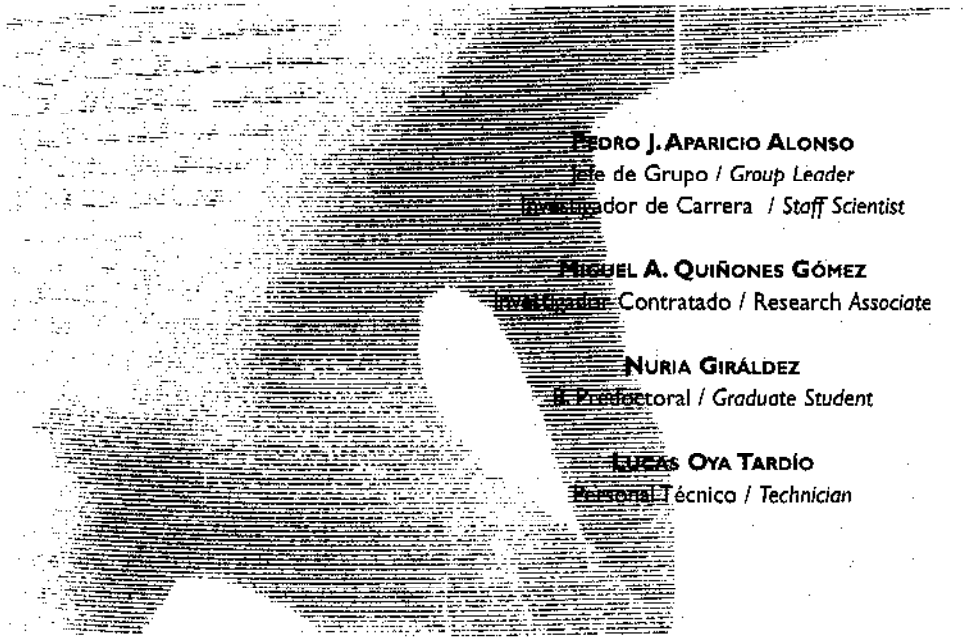
— Gomis-Rüth, F.X., Solá, M., Pérez-Luque, R., Acebo, P., Alda, M.T., González, A., Espinosa, M., del Solar, G., and Coll, M. (1998). Overexpression, purification, crystallyzation and preliminarry X-Ray diffraction analysis of the pMV158-encoded plasmid transcriptional repressor protein CopG. FEBS Lett. *425*, 161-165.

— Grohmann, E., Moscoso, M., Zechner, E., del Solar, G., and Espinosa, M. (1998). *In vivo* definition of the functional origin of leading strand replication of the lactococcal plasmid pFX2. Mol. Gen. Genet. *260*, 38-47.

— Kramer, M.G., Espinosa, M., Misra, T.K., and Khan, S.A. (1998). Lagging strand replication of rolling-circle plasmids: specific recognition of the *ssoA*-type origins in different Gram-positive bacteria. Proc. Natl Acad. Sci. USA *95*, 10505-10510.

— Kramer, M.G., Khan, S.A., and Espinosa, M. (1998). Lagging strand replication from the *ssoA* origin of plasmid pMV158 in *Streptococcus pneumoniae*: *in vivo* and *in vitro* influence of mutations in two conserved *ssoA* regions. J. Bacteriol. *180*, 83-89.

Fotobioquímica Vegetal
Plant Photobiochemistry



Pedro J. Aparicio Alonso
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Miguel A. Quiñones Gómez
Investigador Contratado / Research *Associate*

Nuria Giráldez
E. Predoctoral / *Graduate Student*

Lucas Oya Tardío
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Microalgas, asimilación de nitrato y bicarbonato, fotorregulación por luz azul-UV, transporte de iones.

Keywords: Microalgae, nitrate and bicarbonate assimilation, blue-UV light photoregulation, ion transport.

Las radiaciones de longitud de onda corta correspondientes a la luz ultravioleta y azul desempeñan en los vegetales un destacado papel como señales del medio para regular y coordinar diversos procesos metabólicos y morfogenésicos. En organismos fotosintéticos destaca por su importancia la asimilación de los compuestos oxidados de carbono y nitrógeno para la formación de los compuestos orgánicos nitrogenados que constituyen la base de la materia viva.

Los resultados más recientes de nuestro grupo han puesto de manifiesto que en *Monoraphidium braunii*, un alga verde unicelular, las incorporaciones de los aniones monovalentes de interés nutricional como el NO_3^- (fuente de nitrógeno) y el HCO_3^- (fuente exclusiva de carbono a pHs por encima de 8), así como el NO_2^- y el Cl^-, dependen de la irradiación de

Short wavelength radiations play an important role in plants as signals from the environment for the regulation and co-ordination of different metabolic and morphogenesic processes. In photosynthetic organisms the assimilation of oxidised nitrogen and carbon compounds is particularly important for the generation of the organic nitrogen compounds of the living matter.

Our most recent results have shown that in Monoraphidium braunii, a unicellular green alga, the uptake of nutritionally relevant monovalent anions such as NO_3^- *(nitrogen source) and* HCO_3^- *(main source of carbon above pH 8) as well as* NO_2^- *and* Cl^-*, depends on the irradiation of cell suspensions with UV and/or blue light. These radiations work as a switch which activates the transport system(s) for these anions in a few seconds. When these radiations were suppressed, the*

las suspensiones celulares con luz ultravioleta y/o con luz azul. Estas radiaciones actúan a modo de conmutador activando el sistema o sistemas de transporte de estos aniones en cuestión de segundos. Cuando estas radiaciones se suprimen, la incorporación de estos aniones cesa a los pocos minutos. La similitud de las características cinéticas de los transportes de NO_3^- y de Cl^-, unida al carácter competitivo de la incorporación de estos aniones, permite sugerir que este alga dispone de un único transportador para la incorporación de estos aniones. Igualmente, los espectros de acción de la entrada de NO_3^- y Cl^- resultaron ser prácticamente idénticos con máximos a 480, 450, 375 y 260 nm, lo que sugiere la existencia de un único fotorreceptor de tipo flavín-pterínico.

Nuestros últimos resultados ponen de manifiesto que las células de *M. braunii* incorporan el HCO_3^- como tal anión en un proceso dependiente tanto de la energía quimiosmótica generada por la ATPasa de sus membranas plasmáticas como de la iluminación con luces ultravioleta y/o azul. El sistema de transporte de HCO_3^- es específico para este anión, está ausente en células cultivadas con concentraciones saturantes de CO_2 y su biosíntesis nuclear se induce al reducirse las tensiones de este gas.

El espectro de acción de la entrada de HCO_3^- resultó ser idéntico al de los aniones monovalentes anteriormente citados. Estos datos permiten concluir que un mismo fotorreceptor de luz azul-UV es el encargado de modular, no solamente la asimilación del nitrógeno, sino también la asimilación de carbono. Es probable que la homeostasis de estas células también dependa en gran medida de las señales captadas por este fotorreceptor puesto que la entrada de otros aniones, como el Cl^-, también está regulada por la luz azul y/o ultravioleta.

Los resultados de otros grupos europeos permiten sugerir que probablemente sea la propia nitrato reductasa (enzima que contiene flavinas y pterinas como grupos prostéticos) unida a la membrana plasmática la que actúa como fotorreceptor. Esperamos que en el futuro estos resultados puedan contribuir a elucidar la fotorregulación del transporte de iones en otras especies de algas como *Chlamydomonas reinhardtii* y en células de plantas superiores.

uptake of any of these anions ceases in a few minutes. The similarity in the kinetic characteristics of the transports of NO_3^- and Cl^-, along with their competitive nature, suggests that the same transport system is responsible for the uptake of these two anions in this organism. Moreover, the action spectra for the NO_3^- and Cl^- uptakes resulted almost identical with maxima at 480, 450, 375 and 260 nm, which suggests the existence of only one photoreceptor of flavin-pterinic nature.

Lately, we have detected that M. braunii cells take up HCO_3^- *as such in a chemiosmotic energy-dependent process. This active uptake of HCO_3^- is also under the strict control of UV and blue light. The HCO_3^- transport system is specific for this anion. It is absent in cells grown with saturating CO_2 tensions and its nuclear biosynthesis starts as the CO_2 tensions diminish.*

The action spectrum for the uptake of HCO_3^- is almost identical to those of NO_3^- and Cl^-. These data lead to the conclusion that in M. braunii the same UV- and blue light photoreceptor takes care of the modulation of the assimilation of both nitrogen and carbon. The homeostasis of these cells may depend to a great extent on the signals received by this photoreceptor since the uptake of other anions as Cl^- is also regulated by UV- and/or blue light.

Results from other groups suggest that the main role of plasma membrane nitrate reductase (a flavin-pterin enzyme) would be to act as photoreceptor for most relevant monovalent anions. We hope that, in the future, these results will contribute to the elucidation of the photoregulation of ion transport in other algae such as Chlamydomonas reinhardtii, and in higher plant cells.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*:

— DGICYT, PB95-0554 (1996-1999).

— DGICYT, PB96-0554-CO1 (1996-1999).

— DGICYT, PB 96-0807 (1997).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Quiñones, M.A., Giráldez, N., Witt, F.G. and Aparicio, P.J. (1997). Blue light-dependent monovalent anion uptake.Physiol. Plant., *100*, 45-52.

— Giráldez, N., Aparicio, P.J. and Quiñones, M.A. (1998). Blue light-requirement for HCO_3^- uptake and its action spectrum in *Monoraphidium braunii*. Photochem. Photobiol. *68*, 420-427.

— Quiñones, M.A., Lu, Z., and Zeiger, E. (1998). Genetic variation of stomatal conductance, blue light sensitivity and zeaxanthin content in guard cells of Pima cotton (*Gossypium barbadense L.*). Physiol. Plant. *103*, 560-566.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Quiñones, M.A., Giráldez, N., Witt, F.G. and Aparicio, P.J. (1998). Incorporación de aniones monovalentes dependiente de luz azul en *Monoraphidium braunii*. En: Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: de la Fisiología a la Biología Molecular. J. M. Vega, P.J. Aparicio, F. Castillo y J. M. Maldonado, eds. (Universidad de Sevilla, Sevilla) pp 387-402.

Interacciones Macromoleculares. Proteínas del Citoesqueleto y Adhesión Celular

Macromolecular Interactions. Cytoskeletal and Cell Adhesion Proteins

Germán Rivas Caballero
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Allen P. Minton (VII-VIII, 1998)
Investigador Visitante / *Visiting Scientist*

Javier Fernández Martínez (Desde III-1998)
Begoña García Alvárez (Hasta II-1998)
Marta Lages Gonzalo (Desde VI-1998)
Asunción López Fernández (Desde III-1998)
B. Predoctorales/ *Graduate Students*

Palabras clave: Tubulinas, FtsZ, división celular, fibrinogeno, aglomeración macromolecular, cationes divalentes, centrifugación analítica, bioquímica física.

Las proteínas y otras macromoléculas biológicas constituyen al menos un 20-30% del total de la masa (y el volumen) de todos los sistemas biológicos que, expresado en términos de concentración, supone cientos de mg/mL (Fig. 1). Este fenómeno de aglomeración macromolecular puede afectar considerablemente a la energética de reacciones y procesos intracelulares funcionales. Nuestro grupo está interesado en conocer i) el efecto de condiciones de aglomeración macromolecular semejantes a las existentes *in vivo*, y ii) el papel de cationes divalentes (moduladores fisiológicos de procesos bioquímicos y celulares) sobre la conformación, ensamblaje y asociaciones funcionales de proteínas del citoesqueleto y adhesión celular con interés farmacológico. Para la realización de estos objetivos empleamos técnicas para la caracterización de interacciones ligando-receptor y métodos biofísicos, como espectroscopía de fluorescencia (con los Drs. A.U. Acuña y P. Lillo, Inst.Quím.Fís., CSIC, Madrid), dicroísmo circular, biosensores ópticos (con el Dr. P. Schuck, NIH, USA) y, en especial, centrifugación analítica.

Keywords: Tubulin, FtsZ, cell division, fibrinogen, macromolecular crowding, divalent cations, analytical centrifugation, physical biochemistry.

Proteins and other biological macromolecules constitute at least 20-30% of the total mass (and volume) of all living organisms, which, in terms of total concentration would amount hundreds of mg/mL (Fig. 1). This phenomena of macromolecular crowding can have a considerable effect on the energetics of functional intracellular reactions and processes. Our group is interested in the understanding of the role of i) macromolecular crowding, and ii) divalent cations (physiological modulators of biochemical and cellular processes) on the conformation, assembly, and functional associations of cytoskeletal and cell adhesion proteins with pharmacological interest. To fulfill these aims we use techniques to characterize ligand-receptor interactions and biophysical methods, like fluorescence spectroscopy (with Drs. A.U. Acuña and P. Lillo, Inst. Quím. Fís., CSIC, Madrid), circular dichroism, optical biosensors (with Dr. Peter Schuck, NIH, USA), and, mainly, analytical centrifugation.

Métodos avanzados de centrifugación analítica

En colaboración con el grupo del Dr. Allen Minton (National Institutes of Health, Bethesda, USA) desarrollamos y aplicamos métodos de equilibrio de sedimentación con trazadores, que son únicos para la medida de la actividad, estado de asociación e interacciones funcionales de proteínas individuales en condiciones de aglomeración macromolecular. Esta información creemos que es relevante para entender correctamente la energética de procesos bioquímicos en medios fisiológicos. En paralelo, colaboramos con el grupo del Dr. R. Díaz-Orejas (CIB-CSIC) en la caracterización molecular de las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA en sistemas de replicación bacteriana.

Interacciones funcionales de proteínas del citoesqueleto (tubulina y FtsZ) blanco de acción de agentes terapéuticos

La tubulina ensambla reversiblemente para formar los microtúbulos, que son estructuras supramoleculares dinámicas, esenciales para la división celular en eucariotas y dianas biológicas de diversos agentes antitumorales. La proteína FtsZ, homóloga procariota de la tubulina, juega un papel central en el proceso de septación durante la división bacteriana, lo que hace de ella una atractiva diana de acción antibacteriana. Los procesos de asociación y ensamblaje de FtsZ son relevantes para su función biológica. Para entender el papel específico de los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) en la estructura y función de FtsZ, caracterizamos cuantitativamente el efecto de estos cationes sobre 1) las propiedades y mecanismos de asociación de FtsZ y 2) el equilibrio y cinética de ensamblaje de FtsZ. Caracterizamos, además, las propiedades de asociación y ensamblaje de estas proteínas del citoesqueleto en condiciones de aglomeración macromolecular semejantes a las fisiológicas. Estos estudios serán de interés para comprender el modo de acción de agentes antitumorales y antibacterianos, y han de ser tenidos en cuenta en el diseño de ensayos de identificación de nuevas sustancias con potencial terapéutico. Proyecto en asociación con los grupos de los Drs. J.M. Andreu (CIB-CSIC) y M. Vicente (CNB-CSIC).

Advanced analytical centrifugation methods

In collaboration with Dr. Allen Minton's group (National Institutes of Health, Bethesda, USA) we develop and apply tracer sedimentation equilibrium methods which are unique to measure the activity, state of association and functional interactions of individual proteins in highly crowded solutions. We believe that this information is of importance for the correct understanding of the energetics of biochemical reactions in physiological media. In parallel, we collaborate with the group of Dr. R. Díaz-Orejas (CIB-CSIC) in the molecular characterization of protein-protein and protein-DNA interactions of bacterial replication systems.

Functional interactions of cytoskeletal proteins (tubulin and FtsZ) target of therapeutic agents

Tubulin reversibly assembles to form microtubules, dynamic supramolecular structutures which are essential in eukaryotic cell division and are the biological targets of a variety of antimitotic drugs. The prokaryotic homolog of tubulin, the protein FtsZ, plays a central role in the septation during bacterial cell division, which makes it an attractive target for antimicrobial agents. The processes of FtsZ association and assembly are relevant in its biological function. To understand the specific role of divalent cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}) in the structure and function of FtsZ we quantitatively characterize the effect of these cations on 1) the properties and mechanisms of FtsZ association, and 2) the equilibrium and kinetics of FtsZ assembly. In addition, we characterize the association and assembly of these cytoskeletal proteins in highly crowded media resembling physiological milieux. These studies will be relevant to properly understand the mechanism of action of antitumoral and antimicrobial drugs, and have to be taken into consideration when diagnostic test are designed to identify new candidate drugs. Project in association with the groups of Drs. J.M. Andreu (CIB-CSIC) and M. Vicente (CNB-CSIC, Madrid).

Functional interactions of vascular cell adhesion proteins

We explore proteins of blood plasma involved in vascular cell adhesion processes (i.e., hemostasis, platelet aggregation). Our specific goal is to determine the effect of macromolecular crow-

Interacciones funcionales de proteínas de adhesión celular vascular

Exploramos proteínas del plasma sanguíneo implicadas en procesos vasculares de adhesión celular (ej, hemostasia, agregación plaquetaria). Nuestro objetivo específico es determinar el efecto de condiciones de aglomeración macromolecular semejantes a las existentes en el plasma (concentración total de proteína 80 mg/mL) sobre la conformación molecular, estado de asociación e interacciones heterólogas funcionales de proteínas de adhesión celular (ej., fibrinógeno). Hemos encontrado que, a concentraciones totales de proteína semejantes a las del plasma, 1) el coeficiente de actividad del fibrinógeno es alrededor de diez veces mayor que su concentración y 2) el estado de asociación dominante del fibrinógeno no es el monomérico a niveles fisiológicos (mM) de cationes divalentes. Esta información es relevante para comprender los mecanismos moleculares de la hemostasia y ha de ser considerada en el diseño y optimización de ensayos *in vitro* de antagonistas plaquetarios. Contamos con el apoyo del grupo del Dr. J. González (Inst. Quím. Fís., CSIC, Madrid).

ding, resembling plasma (total protein concentration 80 mg/mL), on the molecular conformation, state of association, and functional heterologous interactions of cell adhesion proteins (i.e., fibrinogen). We have found that at total protein concentration similar to plasma: 1) the activity coefficient of fibrinogen is about ten times higher than its concentration, and 2) the dominant state of association of fibrinogen is not monomeric at physiological (mM) levels of divalent cations. This information is relevant to understand the molecular mechanisms of hemostasis and has to be considered in the design and optimization of in vitro *assays of platelet antagonists. We have the support* of the laboratory of Dr. J. González (Inst. Quím. Fís., *CSIC, Madrid).*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— Acciones Integradas Hispano-Austríacas (1997).

— DGES. PB95-0120 (1996-99).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Abril, A., Salas, M., Andreu, J.M., Hermoso, J. M., and Rivas, G. (1997). Phage 029 protein p6 is in monomer-dimer equilibrium in solution which shifts to higher order states of association at the (milimolar) concentrations found *in vivo*. Biochemistry *36*, 11901-11908.

— Lozano, R., Rivas, G., and Giménez-Gallego, G. (1997). Destabilization, oligomerization and inhibition of the mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor by aurantricarboxylic acid. Eur. J. Biochem. *248*, 30-36.

— Soengas, M. S., Mateo, C. R., Rivas, G., Salas, M., Acuña, A.U., and Gutiérrez, C. (1997). Structural features of 029 single-stranded DNA binding protein. II. Global conformation of 29 SSB and the effects of complex formation on the protein and the ssDNA. J. Biol. Chem. *272*, 303-310.

— Acebo, P., García de Lacoba, M., Rivas, G., Andreu, J. M., Espinosa, M., and del Solar, G. (1998). Structural features of the plasmid pMV-158-encoded transcriptional repressor CopG, a protein sharing similarities with both helix-turn-helix and b-sheet DNA-binding proteins. Proteins *32*, 248-261.

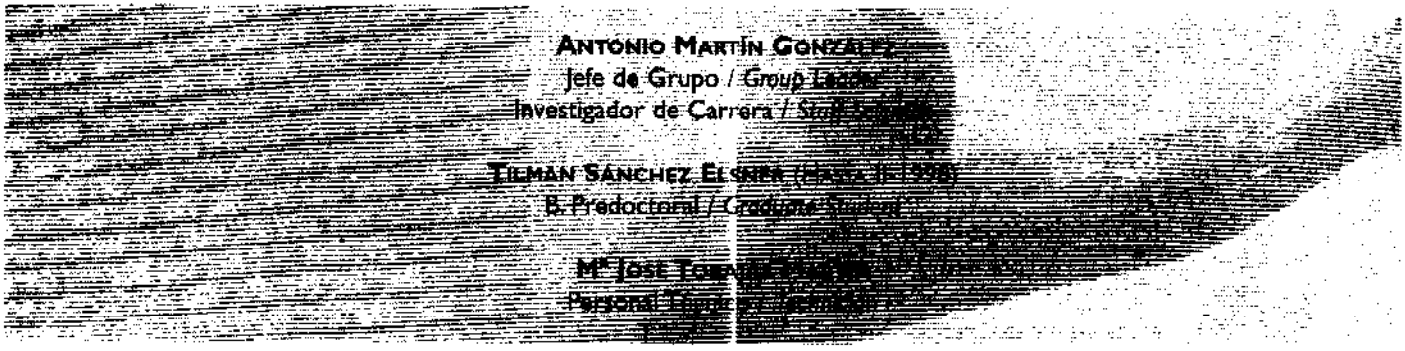
— Menéndez, M., Rivas, G., Díaz, J. F., and Andreu, J. M. (1998). Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high-affinity bound magnesium at the nucleotide N-site. J. Biol. Chem. *273*, 167-176.

— Vázquez, M.I., Rivas, G., Cregut, D., Serrano, L., and Esteban, M. (1998). The vaccinia virus 14kDa (A27L) fusion protein forms a triple coiled-coil structure and interacts with the 21kDa (A17L) virus membrane protein through a C-terminal a-helix. J. Virol. *72*, 10126-10137.

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

Jefe de Departamento	**Ramón B. Rodrí[illegible]**
Department Head	**Roberto Parr[illegible]** [illegible] X-1997)
Profesor de Investigación	**Rober[illegible]ez**
Investigadores Científicos	**Jo[illegible] Zarrabe**
	[illegible]rtín [illegible]z
	[illegible]ríguez [illegible]
Científicos Titulares	**Angela Casado Mora[illegible]**
	[illegible] García Hermida
	[illegible] Alarc[illegible]
	[illegible] Cañada
	[illegible]
	Ramón B. Rodríguez [illegible]
Personal Técnico	**María [illegible]**
	Mª [illegible]ernández
	[illegible] Fontela Casado
	Mª Encarnación López Fernández
	Juana Mª Lorenzo Vián
	Mª Carmen Pérez Lamigueiro
	Mª José Tobajas Martín
Secretaria	**Olvido Partearroyo Laca[illegible]**

Fijación Directa del N_2
Direct N_2 Fixation



Antonio Martín González
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Tilman Sánchez Elsner (Hasta II-1998)
B. Predoctoral / *Graduate Student*

Mª José Tor[illegible]
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Fijación de N_2, *Azotobacter, Azospirillum*, Biofertilizantes, factores de crecimiento.

Estudiamos los factores de crecimiento y la fijación de N_2 por mutantes específicos de *Azotobacter* y *Azospirillum* con mayor actividad biológica para su empleo como biofertilizantes.

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

Explotación y desarrollo de la Patente "Fertilizante bacteriano y procedimiento de obtención", (Nº 9500851. Empresa-CSIC), 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.

Los objetivos fundamentales de esta planta son, entre otros, la producción de biofertilizantes fijadores de N_2 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.

Keywords: N_2 fixation. Azotobacter, Azospirillum, *Biofertilizers. Growth agents.*

We are studying growth agents and the N_2 fixation by specific mutants of. Azotobacter *and* Azospirillum *with a higher activity in order to use them as biofertilizers.*

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

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

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.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

— Martín González, A. (1998). Planta piloto de biofertilizantes fijadores de N_2. Techno-Ambiente N87-IX, 23-26.

Genética Humana
Human Genetics

José Antonio Abrisqueta Zarrabe
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Carlos Rodríguez Murcia
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Vitalino Aller Racimo
María Ángeles Martín Lucas
Juan Menaya Fernández
Investigadores Visitantes / *Visiting Scientists*

Mª Amparo Cerrajero Hernández
Mª Carmen Pérez Lamigueiro
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Anomalías genéticas, prevención, consejo genético.

Prevención de minusvalías mediante el consejo genético

Este proyecto de investigación, realizado por nosotros en colaboración con el Centro Especial del Instituto Social de las Fuerzas Armadas (CEISFAS), tiene una doble finalidad. Por una parte, detectar en una población adulta de deficientes las anomalías genéticas que hubiera, precisando sus características y la importancia de las mismas. Por otro lado, con la información obtenida, prestar el oportuno asesoramiento genético a los familiares de los pacientes, con objeto de prevenir posibles futuras anomalías, que pudieran causar algún tipo de discapacidad o minusvalía en la progenie.

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

Cuestiones éticas relacionadas con la genética del desarrollo embrionario humano

El objetivo de este proyecto es el juicio ético que merece el embrión humano, particularmente en las fases iniciales de

Keywords: Genetic anomalies, prevention, genetic counseling.

Prevention of deficiencies through genetic counseling

This research projet carried out by us with the collaborative efforts of the Centro Especial del Instituto Social de las Fuerzas Armadas (CEISFAS) had a double purpose. On the one hand, to detect potential genetic anomalies in an adult population examining and evaluating the importance of their characteristic traits. On the other hand, once the information was obtained, to provide an appropiate genetic counseling to the relatives of the patients, with the aim to prevent subsequent anomalies which might give rise to some type of disabilities or handicaps in the offspring.

Keywords: Human embryo, developmental genetics, bioethics.

Ethical questions related to the genetical development of the human embryo

In this study we approach an ethical assessment of human embryo, particularly in its early stages of development.

su desarrollo. El estudio implica el análisis detallado de los sucesos que acontecen a nivel genético y morfológico durante los estadíos del desarrollo embrionario, y en los que el propio embrión actúa como sujeto que experimenta los cambios y las transformaciones.

Partiendo de nuestra experiencia de más de 34 años dedicados al estudio genético de anomalías del desarrollo humano, se estudiarán los datos más recientes sobre los mecanismos de regulación de la embriogénesis, destacando la base genética que subyace en todo ese proceso y la eventual importancia del factor ambiental.

En el horizonte de esta investigación figuran cuestiones tan importantes como: qué significa "vida humana", cuándo y cómo debe protegerse o en qué consiste la "individualidad" del ser humano.

Our work implies a detailed analysis of the events occurring at both genetic and morphological levels, at which the embryo itself is acting like a subject undergoing a complicated process of changes and transformations.

Based on our long-lasting experience of more than 34 years devoted to studying genetic anomalies of human development, we will address a careful analysis of the more recent data on the mechanisms regulating embryogenesis, pointing out the genetic basis underlying the whole process as well as the eventual significance of enviromental factors.

Such important questions as: What does human life mean?, when and how does it deserve protection?, how should we understand the individuality of the human being?, will appear on the horizon of this study.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— Real Patronato de Prevención (1997-1998).

— Fundación Ramón Areces (1998-2000).

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

— Abrisqueta, J.A. (1997). A su imagen: a propósito del debate de la clonación. XX SIGLOS. VIII, *34*, 116-121.

— Abrisqueta, J.A. (1997). Perspectivas actuales del Proyecto Genoma Humano. TEMAS, *33-34*, 18-21.

— Abrisqueta, J.A. (1997). ¿Todos iguales? Implicaciones de la clonación. Verdad y Vida. Tomo LV. Nums. *217-220*, 443-452.

— Abrisqueta, J.A. (1997). Perspectivas jurídicas y ético-morales de la clonación. ECCLESIA. Num. *2.855-56*, 6-7.

— Abrisqueta, J.A. (1998). Síndrome de Down: Perspectivas actuales. Anales Real Academia de Farmacia. *64*, 421-440.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Abrisqueta, J.A. (1998). Discriminación genética y convivencia. Monografía: La Convivencia en la Información y Orientación Familiar y Social. 54-64. ISBN 84-605-5518-6. Madrid.

Artículos de Divulgación/*Press Articles*

— Abrisqueta, J.A. (1997). Fecundidad y Planificación Familiar. SAP. *565*. 29-32.

Marcadores Tumorales y Procesos de Envejecimiento
Tumoral Markers and Aging Processes

Ángela Casado Moragón
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigadora de Carrera / *Staff Scientist*

Mª Encarnación López Fernández
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Alfa Fetoproteína (AFP), valor diagnóstico, prevención.

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

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. 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.

Palabras clave: Radicales libres, envejecimiento, SOD, CAT, MDA.

Radicales libres y envejecimiento

Bajo condiciones fisiológicas normales el uso de oxigeno por células de organismos aeróbicos genera metabolitos de

Keywords: Alpha Fetoprotein (AFP), diagnostic value, prevention.

Alpha-fetoprotein as a tumoral marker

Serum Alpha-fetoprotein (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. The objectives of this work is 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 analize 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.

Keywords: Free radicals, aging, SOD, CAT, MDA.

Free radicals and aging

Under normal physiological conditions, the use of oxygen by cells of aerobic organism generates potentially deleterious reactive oxygen metabolites (ROMs). A chronic state of oxidative stress exists in cells because of an imbalance between prooxidants and

oxigeno reactivo potencialmente deletereos (ROMs). Existe en las células un estado crónico de estrés oxidativo debido a un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes. La cuantía del daño oxidativo crece con la edad del organismo y se supone que es el principal factor causante de la senectud. El principio básico de la hipótesis del estrés oxidativo es que la pérdida de funcionalidad relativa a la senectud se debe a la progresiva e irreversible acumulación de daños oxidativos moleculares. La etiología de un aumento, asociado a la edad, en la cuantía del estrés oxidativo, puede ser debida a tres factores diferentes: 1) un incremento en la tasa de formación de ROMs; 2) El declinar de las defensas antioxidativas; y 3) El declinar de la eficiencia de reparación o remoción de las moléculas dañadas. Los objetivos de este trabajo se centran en: 1) la determinación de dos enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), y 2) la valoración de malondialdehido (MDA), marcador de peroxidación lipídica. Estas determinaciones se realizan en población sana y normal y en pacientes con desórdenes de envejecimiento.

antioxidants. The amount of oxidative damage increases as an organism ages and is postulated to be a major causal factor of senescence. A hypothesis ascribing one cause for aging postulates that the senescence-associated loss of functional capacity is due to the accumulation of molecular oxidative damage- The etiology of an age-associated increase in the amount of oxidative stress can be linked to three different factors: 1) an increase in the rate of generation of ROMs; 2) a decline in antioxidative defenses, and 3) a decline in the efficience of repair or removal of damaged molecules. This work is focussed on: 1) determination of two antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), y 2) evaluation of malondialdehyde (MDA) marker of lipid peroxidation. These determinations are made in normal and healthy populations and in patients with aging disorders.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— FIS, 0166 (1997-1999).
— Fundación Yébenes-Velo (1998-1999).
— INRCA, (1996-1999)
— Sociedad Española de Geriatría y Gerontología (1997-1998).

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

— Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M.E., and De la Torre, R. (1997). Estudio comparativo de los niveles de AFP en pacientes con patologías malignas y benignas del sistema reproductor (masculino y femenino). Neoplasia *14*, 15-18.
— Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M.E., De la Torre, R., Venarucci, D., and Vallese, A. (1997). Alpha-fetoprotein blood levels in patients with testicular cancer. Eur J. Oncol. *2*, 37-39.
— Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M.E., De la Torre, R., and Venarucci, D. (1997). Alpha-fetoprotein blood levels in patients with cancer of the gastrointestinal tract. Eur. J. Oncol. *2*, 319-321.
— Carrascosa, D., Ramírez, M.V., Casado, A., De la Torre, R., López-Fernández, M.E., and Sáez, J. (1997). Prevalence and significance of HBeAg and isolated anti-HBc in several institutions for the mentally retarded in the Autonomous Community of Madrid. Amer. J. Human Biol. *9*, 29-33.
— Carrascosa, D., Casado, A., and López-Fernández, M.E. (1997). Determinación de AFP en pacientes con linfomas: utilidad en el control de la enfermedad tras la administración de la pauta quimioterapéutica. Neoplasia *14*, 80-81.
— Casado, A., Casado, M.C., López-Fernández, M.E., and Venarucci, D. (1997). Thalassemia and G6PD deficiency in Spanish blood donors. Panminerva Med. *39*, 205-207.
— Casado, A., De la Torre, R., Cantalejo, A., Ramos, M., and López-Fernández, E. (1997). Fanconi's anaemia: case history of six spanish families. Bratislava Med. J. *98*, 135-136.
— Casado, A., López-Fernández, M.E., De la Torre, R., Carrascosa, D., Ramírez, V., and Sáez, J. (1997). Anormalidades hematológicas y bioquímicas en el síndrome de Down. Rev. Diagn. Biol. *46*, 84-86.
— Venarucci, D., Venarucci, V., and Casado, A. (1997). Dosaggio delle piridinoline: un utile parametro bioumorale nella patologia neoplastica. Eur. J. Oncol. *2*, 269-271.
— Carrascosa, D., Casado, A., Jiménez., J.A., López-Fernández, M.E., and De la Torre, R. (1998). Utilidad de la alfa fetoproteina (AFP) como marcador biológico del proceso hepatotóxico alcohólico. Rev. Diagn. Biol. *47*, 236-241.
— Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M E., De la Torre, R., and Venarucci, D. (1998). The role alpha fetoprotein (AFP) blood levels in patients with lung cancer. Eur. J. Oncol. *3*, 37-39.
— Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M.E., and De la Torre, R. (1998). The role of Alpha fetoprotein (AFP) levels in patients with gynaecologic cancer. Eur. J. Oncol. *3*, 267-270.
— Carrascosa, D., Casado, A., Valle, J.L., and Cantó, M. (1998). Elevated alpha-fetoprotein (AFP) level in a patient with pancreas carcinoma. Eur. J. Oncol. *3*, 299.
— Casado, A., De la Torre, R., López-Fernández, M.E., Carrascosa, D., and Venarucci, D. (1998). Niveles de superóxido dismutasa y catalasa en enfermedades del anciano. Gaceta Méd. Méx. *134*, 539-544.
— Venarucci, D., Vallese, A., Venarucci, V., Ricciotti, R., Muraro, G.B., and Casado, A. (1998). Treatment with LH-RH agonist in prostate cancer: the importance of biochemical and bone densitometry markers in follow-up. Eu. J. Oncol. *3*, 129-133.

Metabolismo y Patología Molecular
Metabolism and Molecular Pathology

Roberto Parrilla Sánchez
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Laboratorio de Fisiopatología y Genética Molecular Humana

(Grupo/Group 1)
Roberto Parrilla Sánchez
Ramón B. Rodríguez Martínez
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Consuelo González Manchón
Nora Viviana Butta
Investigadoras Contratadas / *Research Associates*

Carmen Avila Rejón (IX-XII, 1998)
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

Milagros Ferrer Aldea (Hasta III-1997)
Jianming Tao
Elena García Arias-Salgado
B. Predoctorales / *Graduate Students*

María José Arias-Salgado Rosby
Personal Técnico / *Technician*

Laboratorio de Regulación Metabólica

(Grupo/Group 2)
Angeles Martín Requero
Ofelia García Hermida
Asunción Jareño Cañada
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Elena Urcelay García
Investigadora Contratada / *Research Associate*

Tomás Fontela Casado
Personal Técnico / *Technician*

Regulación hormonal del metabolismo hepático

El principal objetivo de este estudio fue determinar los mecanismos moleculares implicados en la transducción de señales mediadas por los receptores α_1 adrenérgicos, así como determinar el papel de las hormonas tiroideas modulando la respuesta hepática a la activación α_1 adrenérgica. Para ello nos propusimos 1) establecer una correlación entre perturbación hormonal e intensidad y calidad de los distintos parámetros funcionales hepáticos; 2) determinar y analizar los mecanismos de señalización intracelular involucrados en el control hormonal de la respuesta adrenérgica; 3) estudiar la influencia de los cam-

Hormonal regulation of hepatic metabolism

The primary goal of this study was to determine the molecular mechanisms involved in the hepatic α_1 adrenoreceptors function and the role of thyroid hormones in controlling the hepatic response to α_1 adrenergic activation. To achieve this goal we try: 1) to correlate the hormonal perturbations with hepatic patterns of hepatic α_1 adrenerige responses; 2) to determine and analyzed the intracellular signaling pathway(s) involved in the hormonal control of the α_1 adrenoceptor responsiveness; 3) to study the role of hormone-induced changes in the internal milieu in the mechanism of hormones in controlling the α_1 adrenoceptor responsiveness.

bios en el medio interno inducidos por hormonas sobre la capacidad de respuesta hepática a la estimulación $_1$-adrenérgica.

Fisiopatología y Genética molecular humana

Los objetivos generales en este área han sido: 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 las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas mutantes.

Han sido objeto preferente de atención: **a**) El estudio de las bases moleculares de la tromboastenia de Glanzmann. **b**) La regulación de la homeostasis iónica en células extraneurales y su papel en la etiología de la demencia de Alzheimer. **c**) Clonación y caracterización estructural y funcional de genes humanos regulados por T3.

Human Pathology and Molecular Genetics

The research projects in these fields aimed at: 1) the functional characterization of cells obtained from patients suffering of pathological processes of interest; 2) disclose the existence of genetic structural changes associated with human pathology and determine the relationship between the structural changes and the functional perturbations. For this purpose, we have cloned mutant genes, potentially 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.

*Special attention has been paid to the following subjects: **a**) Elucidation of the molecular basis of Glanzmann's thrombasthenia. **b**) Regulation of ionic homeostasis in extraneural tissues and their role in the pathogenesis of Alzheimer's dementia. **c**) Cloning and structural-functional characterization of human T3 responsive genes.*

Organismos Financiadores/Funding Agencies

— CEE-BIOMED-1 (1993-1997).
— CM, 08.4/0031/1998 (1998-1999).
— DGICYT, PB94-1544 (1995-1997).
— DGICYT, PB97-1240- (1998-2000)
— DGICYT, PM97-0016 (1998-2001).
— FIS, 96/2014 (1996-1999).

Científicos Invitados/Visiting Scientists

— **Carmen Avila Rejón.** Universidad de Veracruz (México). (Septiembre-Diciembre, 1998).

Tesis doctorales /Doctoral Theses

— **Francisco Javier Daza Bertrand.** Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas en el control de la función de los ?$_1$-adrenoreceptores hepáticos. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Directora: Dra. A. Martín Requero.

— **Marta Fernández Pinel.** Estudio Genético-Molecular sobre la tromboastenia de Glanzmann. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Director: R. Parrilla Sánchez.

— **Milagros Ferrer Aldea.** Bases moleculares de la tromboastenia de Glanzmann. Universidad de Alcalá de Henares, 1997. Codirectores: R. Parrilla y C. González-Manchón.

— **Dolores Ibarreta Ruíz.** Aportaciones al estudio de las bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Directora: Dra. M. Sánchez Ayuso.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

— Daza, F.J., Hermida, O.G, Butta N., Parrilla, R., and Martín Requero, A. (1997). L-Triiodothyronine Acutely Impaires the PKC Sensitive Branch of the ?$_1$-Signaling Pathway. Biochem. J. *325*, 631-636.

— Daza, F.J., Parrilla, R., and Martín-Requero, M.A. (1997). Role of thyroid status on the hepatic ?$_1$-adrenoreceptor responsiveness. Am. J. Physiol. *273*, E1065-E1072.

— González-Manchón, C., Butta, N., Ferrer, M., Ayuso, M. S., and Parrilla, R. (1997) Molecular Cloning and Functional Characterization of the Human Cytosolic Malic Enzyme Gene Promoter. Thyroid hormone responsiveness. DNA Cell Biol. *16*, 533-544.

— Ibarreta, D., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. (1997). Altered Ca^{2+} Homeostasis in Lymphoblasts from late-onset Alzheimer's Disease Patients. Alzh. Dis. Assoc. Dis. *11*, 220-227.

— Ibarreta, D., Tao, J., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. (1997) Mutation Analysis of Chromosome19 Calmodulin (CALM3) Gene in Alhzeimer's Disease Patients Neurosci. Lett. *229*, 157-160.

— Rodríguez, S., Vilas, M.P, Sarasquete, M.C, Rodríguez, R.B., Gutiérrez, M.C., and Pérez-Prieto, S.I. (1997). Isolation and preliminary characterization of a Birnavirus from the Sole Solea senegalensis in Southwest Spain. J. Aquatic Animal Health *9*, 295-300.

— Sarasquete, C., Muñoz-Cueto, J.A., García-García, A., and Rodríguez, R.B. (1997). Histochemical and Immunohistochemical aspects of the gonadotrophic cells during reproductive cycle of Fundulus heteroclitus. Scientia Marina. *61*, 439-449.

— Van Delft, J., Uttenthal, L.O., García Hermida, O., Fontela, T., and Ghiglione, M. (1997). Identification of amidated forms of GLP-1 in rat tissues using a highly sensitive radioimmunoassay. Regulatory Peptides *70*, 191-198.

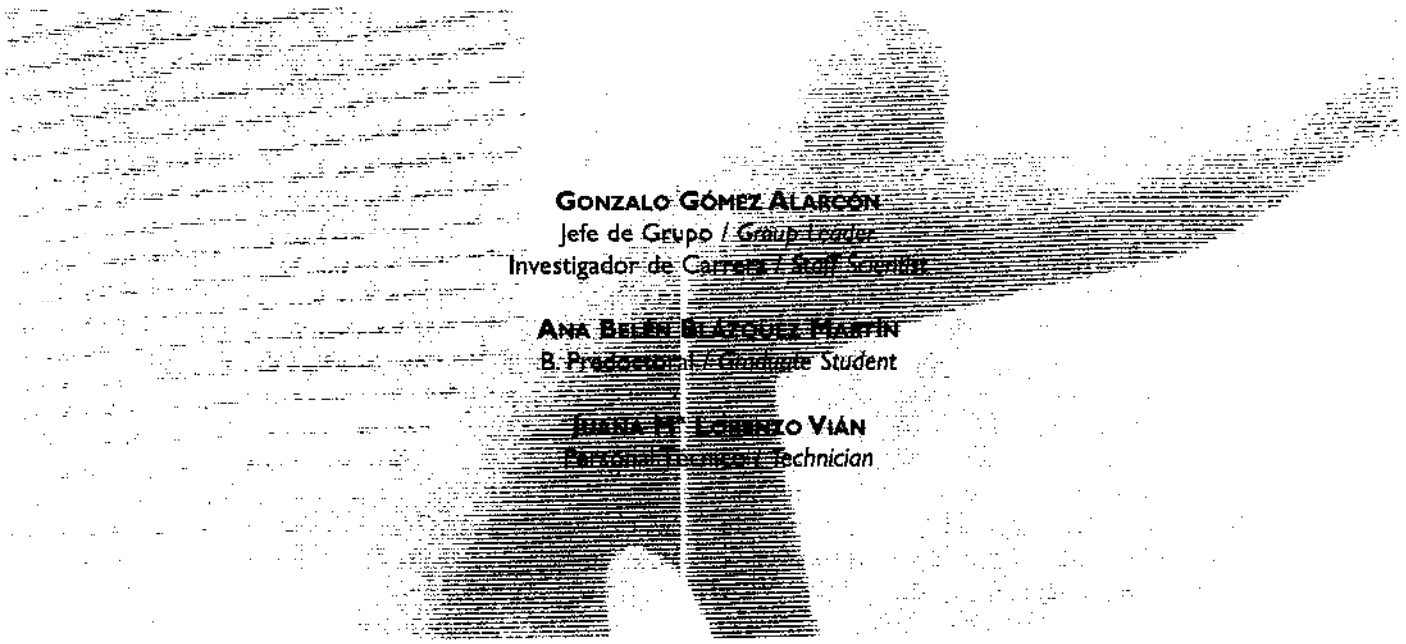
— Daza, F.J., Parrilla, R., and Martín-Requero, A. (1998). L-triiodothyronine acutely impaires the PKC sensitive branch of the ?$_1$-adrenergic signaling pathway in liver. Biochem. J. *331*, 89-97.

— Ferrer, M., Ayuso, M.S., Butta, N., Parrilla, R., and González-Manchón, C. (1998). Role of the α Subunit 326RGV Sequence in the Surface Expression of the Fibrinogen and Vitronectin receptors. Am. J. Physiol. 275 (Cell Physiol. 44) C1239-C1246.

— Ferrer, M., Tao, J., Ayuso, M. S., González-Rodríguez, J., Parrilla, R., and González-Manchón, C. (1998). Truncation of Glycoprotein (GP) IIIa (? 616-762) Prevents Complex Formation with GPIIb: Novel mutation in exon 11 of GPIIIa associated with thrombasthenia. blood 92, 4712-4720.

— Ibarreta, D., Urcelay, E., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. (1998). Distinct pH Homeostatic Features in Lymphoblasts from Alzheimer's Disease Patients. Ann Neurol. *44*, 216-222.

Microbiología Aplicada
Applied Microbiology



Gonzalo Gómez Alarcón
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Ana Belén Blázquez Martín
B. Predoctoral / *Graduate Student*

Juana Mª Lorenzo Vián
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 idóne-

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*

as 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 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.

of biocides and other compounds on different rock types, and in different environments should tested. The interactions between biocides and stones must be understood. Several microbial strains 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.

Organismos financiadores/*Funding Agencies*
— CAM, 06M/024/96 (1996-98).

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

— Flores, M., Lorenzo, J., and Gómez-Alarcón, G. (1997). Algae and bacteria on historic monuments at Alcalá de Henares, Spain. Int. Biodeter. Biodegr. *40*, 241-246.

Departamento de Inmunología
Departament of Immunology

Jefe de Departamento *Department Head*	ANGEL [illegible]O CA[illegible]UIRANTE (Hasta XI-1997)
Investigadores Científicos	C[illegible]IRANTE [illegible]GARC[illegible] [illegible] RODR[illegible] CÓRDOBA [illegible]A ROJO [illegible]NDEZ
Científicos Titulares	[illegible] BARASOAIN B[illegible] [illegible] BOTELLA C[illegible] (Desde V-1998) [illegible] DE LA HERA [illegible]INEZ [illegible] ARIAS [illegible]
Personal Técnico	[illegible]ARES [illegible]ANDEZ DEL CERRO CARMEN LANGA POZA JUANA MARÍA LÓPEZ VERA BÁRBARA MORENO JIMÉNEZ Mª LUISA DEL POZO DEL CAMPILLO Mª SOLEDAD VARA DE REY
Secretaria	OLVIDO PARTEARROYO [illegible]A

Activación de Linfocitos T
T-lymphocyte Activation

José María Rojo Hernández
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Mª José Feito Castellano
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

Gabriel Criado Carrasco
Alejandra Sánchez (Desde VI-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Mª Luisa del Pozo del Campillo
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Linfocitos T, Th1, Th2, TCR, CD4

Keywords: T lymphocytes, Th1, Th2, TCR, CD4.

La expresión de CD4 define una población de linfocitos esencial en el desarrollo normal de respuestas inmunitarias efectivas frente a numerosos patógenos y, también, en la aparición de patologías autoinmunes. Nuestro interés está centrado en el análisis de los mecanismos de actuación de moléculas correceptoras y coestimuladoras en el proceso de activación por antígeno en linfocitos T $CD4^+$.

Influencia de CD4 y CD2 en las señales del complejo TCR/CD3 de líneas T $CD4^+$ de fenotipo Th2.

Las células Th2 presentan ciertas peculiaridades en cuanto a sus características de activación por antígeno (concentración de antígeno, resistencia a la inducción de anergía, señales intracelulares activadas) que no están bien determinadas. Empleando líneas Th2 de ratón, hemos podido determinar que la pequeña fracción de CD4/lck asociada al complejo TCR/CD3 es esencial para las señales tempranas de este complejo. Actualmente esta-

CD4 defines a lymphocyte population essential to the normal development of immune responses against many pathogens as well as the generation of autoimmune diseases. We are interested in analyzing the mechanisms by which coreceptor and costimulatory molecules modify antigen activation in $CD4^+$ T lymphocytes.

Role of CD4 and CD2 in TCR/CD3 signaling in Th2 $CD4^+$ T cell lines

Available data suggest that antigen activation of Th2 T cell lines have some peculiarities regarding optimal antigen concentration, resistance to anergy induction, or intracellular activation pathways which need further definition. Using mouse Th2 T cell lines, we have determined that the small fraction of CD4/Lck associated to the TCR/CD3 complex is basic to early signals triggered through this complex. We are currently analyzing the role of CD4/lck in early activation pathways, as well as the importance of ZAP-70, another tyrosine kinase whose participation in

mos analizando la participación de CD4/lck en las cascadas de activación tempranas, y la participación en las misma de otra tirosina-quinasa (ZAP-70), cuya participación en la activación de células Th2 no está bien determinada. Además, estamos determinando si, como se ha propuesto en otros modelos experimentales, ZAP-70 recluta CD4/lck durante la activación por antígeno, o si sucede a la inversa, y qué consecuencias tendrían estas diferencias en cuanto a las vías de activación puestas en marcha en linfocitos Th1 y Th2.

Por otra parte, hemos analizado funcionalmente CD2 de ratón, una molécula que es, paradójicamente, poco conocida en este sistema experimental. Empleando mutantes de CD2, hemos detectado dos regiones ricas en prolina dentro de su dominio intracitoplásmico que son necesarias para la asociación eficiente de las quinasas lck y fyn. Estas quinasas parecen servir de "puente" intracelular para la asociación física y funcional de CD2 con CD4 y con el complejo TCR/CD3. Incluso, hemos desarrollado modelos de activación en los que la falta de éstas regiones determina una baja respuesta a ligandos del receptor para antígeno.

En colaboración con el grupo del Dr. Umberto Dianzani (U. "Amedeo Avogadro", Novara, Italia), se han empleado líneas Th2 de ratón transfectadas con CD4 humano para analizar cómo la unión de gp120 de HIV-1 a CD4 modifica las asociaciones de CD4 con distintas moléculas, en particular con algunas implicadas en la interacción célula T-endotelio, interfiriendo los mecanismos de localización tisular ("homing") de los linfocitos. La continuación de este trabajo de colaboración ha permitido detectar nuevas moléculas de superficie que influyen en las fases tempranas de infección por el virus HIV-1.

Señales positivas y negativas mediadas por CD4

En sistemas clásicos de coligación de moléculas de superficie mediante anticuerpos monoclonales adsorbidos a placas de cultivo, hemos observado que la proximidad de TCR/CD3 y CD4 puede aumentar o inhibir la proliferación y la síntesis de linfoquinas en linfocitos T $CD4^+$ de bazo, dependiendo de que los anticuerpos estén adsorbidos directamente o indirectamen-

Th2 cell activation is not clear. Furthermore, we are studying whether ZAP-70 recruits CD4/lck during antigen activation as described in other experimental models, or rather it is the other way, and which consequences pose these differences in the activation pathways triggered in Th1 and Th2 lymphocytes.

We have also carried out a functional analysis of mouse CD2. Using mouse CD2 mutants, we have observed that there are two proline-rich regions in the cytoplasmic domain of CD2 necessary for the efficient binding of lck and fyn tyrosine kinases. According to our data, these molecules are likely to serve as intracellular "bridge" for the physical and functional association of CD2 with CD4 or the TCR/CD3 complex. Furthermore, we have developed activation models where loss of these cytoplasmic regions determine low responsiveness to TCR ligands.

In collaboration with Dr. Umberto Dianzani (U. "Amedeo Avogadro", Novara, Italy), mouse Th2 cell lines transfected with human CD4 have been used to analyze how HIV-1 gp120 binding to CD4 changes the association of CD4 with other molecules, particularly some involved in T cell-endothelium interactions, thus interfering homing mechanisms. These studies allowed the identification of some new cell surface molecules involved in the early steps of HIV-1 infection.

Positive and negative signals mediated by CD4

Using classical systems of antibody-mediated coligation of cell surface molecules, we have observed that the proximity of TCR/CD3 and CD4 can enhance or inhibit spleen $CD4^+$ T lymphocyte proliferation and lymphokine secretion, depending on whether the adsorption of antibodies to culture plates is direct or indirect (i.e., by means of anti-Ig antibodies). CD4-mediated inhibition can be reverted by costimuli including CD28 ligands, phorbol esters, or exogenous IL-2. We though that this phenomenon could be an interesting model to analyze self tolerance mechanisms in mature T lymphocytes.

In this system, tyrosine phosphorylation of certain polypeptides is specific or is clearly increased under conditions of CD4-mediated inhibition. Furthermore, these conditions modify the

te por medio de anticuerpos anti-inmunoglobulina. La inhibición mediada por CD4 es revertida por coestímulos tales como ligandos de CD28, ésteres de forbol, o IL-2 exógena. Este fenómeno nos pareció interesante como modelo experimental para estudiar mecanismos de mantenimiento de la tolerancia a los componentes propios en linfocitos T maduros.

En este sistema, hemos observado ciertos sustratos cuya fosforilación en tirosinas es específica de las condiciones inhibidoras, y que éstas alteran la activación (fosforilación) temprana de componentes de las rutas de las MAP quinasas (ERK) y c-jun.

Otras moléculas coestimuladoras

En colaboración con el grupo de la Dra. Pilar Portolés (I.N.B.E, Instituto de Salud Carlos III), hemos generado una serie de anticuerpos monoclonales que detectan moléculas coestimuladoras. Entre los anticuerpos con propiedades coestimuladoras, hemos analizado uno de ellos, específico para Crry/p65, una proteína murina de superficie de tipo I perteneciente a la familia RCA de moléculas reguladoras de la activación del complemento que incluye CR1 (CD35), CR2 (CD21), MCP (CD46) y DAF (CD55).

Aunque está bien establecida la participación de los receptores de complemento CR1 y CR2 en la respuesta a antígeno de linfocitos B, en linfocitos T únicamente se han descrito propiedades coestimuladoras en moléculas RCA ancladas a la membrana por enlaces GPI, como DAF. Nuestros datos indican que ligandos de Crry/p65 aumentan la proliferación y la secreción de linfoquinas de células T de bazo y de líneas T, y que favorecen un patrón de linfoquinas de tipo Th2. Estos fenómenos van paralelos con aumentos en la fosforilación temprana de tirosinas de ciertos sustratos celulares. El análisis de estos sustratos, y el efecto de ionóforos de calcio, ésteres de forbol, y ligandos de CD28 indican que Crry/p65 favorece algunas de las rutas de señales intracelulares activadas por el TCR, principalmente la ruta clásica de las MAP quinasas. Actualmente estamos abordando el análisis mediante mutantes puntuales de la función coestimuladora de esta molécula, y extendiendo los resultados a CD46 (MCP), otra molécula RCA de tipo I expresada en linfocitos T humanos.

activation by phosphorylation of MAP kinase pathways including ras/Raf dependent ERK phosphorylation and JNK-dependent c-jun phosphorylation.

Other costimulatory molecules

In collaboration with Dr. Pilar Portolés (I.N.B.E, Instituto de Salud Carlos III), we have obtained a series of new monoclonal antibodies binding costimulatory molecules. Among these, one is specific for Crry/p65, a mouse type I surface protein belonging to the RCA family of regulators of complement activation which include other surface molecules like CR1 (CD35), CR2 (CD21), MCP (CD46), or DAF (CD55).

It is by now well established the role of complement receptors CR1 and CR2 in antigen responses of B lymphocytes. However, costimulatory properties of RCA family molecules expressed by T lymphocytes have only been described for the GPI-anchored protein DAF. Our data show that Crry/p65 ligands increase proliferation and lymphokine secretion by spleen T cells and T cell lines. Furthermore, it favours a Th2 lymphokine secretion pattern. Coligation of Crry and CD3 enhance early tyrosine phosphorylation of cell substrates. Analysis of phosphorylated substrates, as well as the effect of calcium ionophores, phorbol esters, and CD28 ligands suggest that Crry/p65 favours some of many signaling pathways activated upon TCR ligation, particularly the classical MAP kinase cascade. By means of point mutations, we are currently analyzing the role of different Crry domains in its costimulatory functions, and extending our analysis to CD46 (MCP), as a type I RCA molecule expressed in human T lymphocytes.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CICYT, SAF94-0035-01 (1994-1997).

— FIS, 98/0037-01 (1998-2000).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— María José Feito Castellanos. Análisis funcional de CD2 murino: Papel en la activación de linfocitos y modo de asociación a tirosin-quinasas. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Director: J.M. Rojo.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Bragardo, M., Buonfiglio, D., Feito, M.J., Bonissoni, S., Redoglia, V., Rojo, J.M., Ballester, S., Portolés, P., Malavasi, F., and Dianzani, U. (1997). Modulation of lymphocyte interaction with endothellum and homing by HIV-1 gp120. J. Immunol. *159*, 1619-1627.

— Feito, M.J., Ballester, S., Díez-Orejas, R., Ojeda, G., Criado, G., Portolés, P., and Rojo, J.M. (1997). CD4 dependence of activation threshold and TcR signaling in mouse T lymphocytes. Scand. J. Immunol. *45*, 166-174.

— Feito, M.J., Criado, G., and Rojo, J.M. (1998). Aspectos cuantitativos y cualitativos de la coestimulación mediada por CD2. An. Real Acad. Farm. *64*, 469-498.

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 (Desde II-1998)
Teresa de la Fuente Sánchez
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Mercedes García Gila
José Vicente Moyano Idoeta
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Mercedes Hernández del Cerro
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Fibronectina, integrina α4β1, adhesión, apoptosis/CLL-B.

Interacciones de linfocitos con fibronectina

La adhesión de linfocitos a componentes de matriz extracelular tales como fibronectina (Fn), es fundamental para su migración y localización en órganos linfoides y sitios de inflamación. La adhesión a Fn está mediada por receptores celulares que incluyen proteoglicanos y las integrinas α4β1 y α5β1, e induce señales intracelulares. Nuestro grupo está interesado en las interacciones mediadas por α4β1, la integrina mayoritaria en linfocitos. En concreto estudiamos dos aspectos: 1) la relación entre el estado de activación de la integrina y el reconocimiento de sitios activos en Fn, y 2) las consecuencias biológicas de estas interacciones.

Hemos demostrado previamente que α4β1 en linfocitos reconoce constitutivamente los sitios CS-1 y el dominio Hep

Keywords: Fibronectin, α4β1 integrin, adhesion, apoptosis/B-CLL.

Lymphocyte interactions with fibronectin

Lymphocyte interactions with extracellular matrix components such as fibronectin (Fn), are essential to their migration and localization in lymphoid organs and inflammed tissues. Adhesion to Fn is mediated by specific cell surface receptors including proteoglycans, α4β1 and α5β1 integrins, and usually results in the delivery of intracellular signals. Our laboratory is interested in the interactions mediated by α4β1, the predominant integrin in lymphocytes. We are presently focused on two aspects: 1) the relationship between the activation state of α4β1 and the recognition of active sites in Fn and 2) the biological events that follow the interaction of α4β1 with its various Fn ligands.

We previously reported that lymphocyte α4β1 constitutively recognizes the CS-1 site and Hep II domain in Fn and that upon

II de Fn y que después de activada con el Acm TS2/16, reconoce también la secuencia RGD. Recientemente hemos establecido que el dominio Hep III (repeticiones III4-5) constituye un nuevo dominio de adhesión celular en Fn. Hemos identificado dos sitios activos en esta región: H2, que une α4β1 y α4β7 en estado activado, y HBP/III5 que interacciona con proteoglicanos tipo condroitin sulfato (CSPG). Ambos sitios son sinergísticos y el CSPG es esencial cuando α4β1 está activada con Mn^{2+} pero no cuando se activa por TS2/16 (Moyano y col., J. Biol. Chem. 1999, en prensa). Hemos propuesto que ambos receptores forman un complejo en la superficie celular y que CSPG pueden modular fisiológicamente la función de α4β1. Actualmente estamos tratando de probar esta hipótesis.

Respecto a las consecuencias biológicas de la adhesión a Fn, hemos mostrado previamente que los ligandos CS-1, Hep II y RGD inducen diferentes repuestas tras su interacción con α4β1. También hemos establecido que el estado de activación de la integrina también regula las señales intracelulares. Actualmente estamos estudiando los efectos de adhesión a la región III4-5 de Fn. Esto incluye la reorganización del citoesqueleto, la posible regulación de apoptosis y el papel de esta región en la formación de matrices de Fn.

Regulación de la apoptosis en LLC-B por moléculas de adhesión

La leucemia linfoide crónica (LLC) es una enfermedad linfoproliferativa principalmente de células B y es la leucemia de mayor incidencia en países occidentales. Las células LLC-B circulan continuamente sin morir y por tanto constituyen un modelo importante para estudiar la apoptosis. Nuestro grupo está interesado en los mecanismos implicados en la supervivencia de células LLC-B, particularmente en las señales generadas a través de α4β1. Recientemente hemos mostrado que la interacción de α4β1 con un fragmento de Fn que contiene el sitio CS-1 o con el ligando endotelial VCAM-1, previene la apoptosis espontánea de células LLC-B en cultivo. Este efecto es debido parcialmente a la elevación del cociente Bcl-2/Bax como consecuencia de la adhesión (de la Fuente y col. Leukemia, 1999, en prensa).Actualmente

activation with the anti-β1 mAb TS2/16, also binds to the RGD site. Recently, we have established that the Hep III domain (repeats III4-5) constitutes a novel cell adhesion domain in Fn. We have identified two active sites in this region: H2, which is a ligand for activated (but not resting) α4β1 and α4β7 integrins, and HBP/III5, wich interacts with chondroitin-sulfate proteoglycans (CSPG) at the cell surface. We have also established that both receptors act in a cooperative manner and that CSPG are essential when α4β1 is activated with Mn^{2+} but have a minor role when activation is achieved with TS2/16 (Moyano et al., J. Biol. Chem. 1999, in press). We propose that both receptors form a complex at the cell surface and that CSPG may be physiological modulators of the function of α4β1 integrin. Our current studies are aimed to prove this hypothesis.

With respect to the biological consequences of adhesion of α4β1 to Fn, we previously showed that the CS-1, Hep II and RGD ligands induce different responses upon binding to α4β1. We have also established that the activation state of the integrin also regulates intracellular signaling. We are currently studying the effects of lymphoid cell adhesion to the Fn III4-5 region. These studies include the cytoskeleton reorganization, the posible regulation of apoptosis and the role of this region in the formation of Fn matrices.

Regulation of apoptosis in B-CLL cells by adhesion molecules

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disease mainly involving B cells (B-CLL), which constitutes the major type of leukemia in western countries. B-CLL cells continuosly circulate in the body in an arrested state and therefore constitute an important model for the study of apoptosis. We are interested in the mechanisms involved in the survival of B-CLL cells, particularly in the signals generated via α4β1 integrin. We have recently shown that α4β1 interaction with a Fn fragment that contains the CS-1 site or with the endothelial ligand VCAM-1, prevents the spontaneous apoptosis of B-CLL cells in culture. This effect is partially due to the upregulation of the Bcl-2/Bax ratio following cell adhesion (de la Fuente et al., Leukemia, 1999, in press).*We are currently studying the induc-*

estamos estudiando la inducción de otras señales anti-apoptóticas incluyendo la regulación de Fas y FasL, el papel de CD40L, la activación de caspasas, liberación de factores solubles, etc. También estamos caracterizando la respuesta *in vitro* de estas células a drogas normalmente empleadas en el tratamiento de esta enfermedad. Además, utilizando técnicas de expresión de mRNA diferencial, estamos caracterizando posibles diferencias de expresión de genes entre estas células y linfocitos B normales.

tion of other anti-apoptotic signals including the regulation of Fas and FasL, the role of CD40L, activation of caspases, possible release of soluble factors, etc. We are also characterizing the in vitro *response of B-CLL cells to drugs normally used for the treatment of this disease. Furthermore, by using differential gene display techniques we are characterizing possible differences in gene expression between these cells and normal B lymphocyes.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 07/029/96 (1997).
— CAM, 08.1/0012/1997 (1998-2000).
— CICYT, SAF 94-0117 (1994-1997).
— CICYT, SAF97-0064-C03-02 (1997-2000).
— FIS, 94-0277 (1994-1997).

Publicaciones/*Publications*

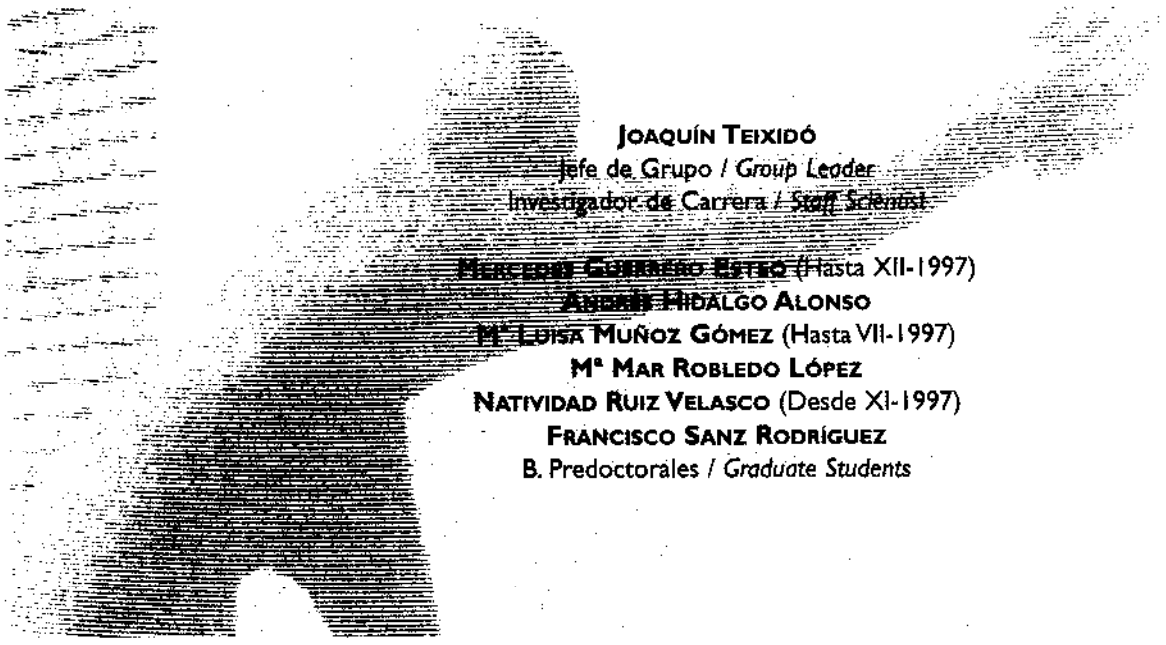
Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Moyano, J.V., Carnemolla, B., Domínguez-Jiménez, C., García-Gila, M., Albar, J. P., Sánchez-Aparicio, P., Leprini, A., Querzé, A., Zardi, L., and García-Pardo, A. (1997). Fibronectin type III5 repeat contains a novel cell adhesion sequence, KLDAPT, which binds activated α4β1 and α4β7 integrins. J. Biol. Chem. 272, 24832-24836.
— García-Gila, M., Cabañas, C., and García-Pardo, A. (1997). Analysis of the activation state of α4β1 integrin in human B cell lines derived from myeloma, leukemia or lymphoma. FEBS Lett. *418*, 337-340.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— García-Pardo, A. (1997). Adhesión celular y sistema inmunitario. En Introducción a la Inmunología Humana, M. Sánchez-Pérez ed. (Madrid: Editorial Síntesis) pp. 169-180.

Biología Celular de las Moléculas de Adhesión
Cell Biology of Adhesion Molecules



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

MERCEDES GUTIÉRREZ ESTEO (Hasta XII-1997)
ANGELES HIDALGO ALONSO
Mª LUISA MUÑOZ GÓMEZ (Hasta VII-1997)
Mª MAR ROBLEDO LÓPEZ
NATIVIDAD RUIZ VELASCO (Desde XI-1997)
FRANCISCO SANZ RODRÍGUEZ
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Identificación de dominios funcionales en la subunidad α4 de las integrinas α4β1 y α4β7

VLA-4 (α4β1) es una molécula de adhesión de la familia de las integrinas que se expresa mayoritariamente en células hematopoyéticas, y que participa tanto en adhesiones célula-matriz extracelular como en interacciones célula-célula. VLA-4 juega un papel central en procesos inflamatorios normales y en patologías inflamatorias, como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple y alergia. Los ligandos principales para VLA-4 son VCAM-1 y la región CS-1 de la fibronectina (CS-1/FN).

La subunidad α4 puede asociarse asimismo con la subunidad ß7 de las integrinas formando el heterodímero α4β7, el cual se expresa principalmente en leucocitos y participa en el "homing" linfocitario hacia intestino y tejidos linfoides asociados, tales como las placas de Peyer. α4β7 media adhesión

Identification of functional domains in the α4 subunit of the integrins α4β1 and α4β7.

VLA-4 (α4β1) is an adhesion molecule from the integrin family, mainly expressed on hematopoietic cells, which is involved in both cell-extracelular matrix and cell-cell adhesions. VLA-4 plays an important role in normal and pathologic inflammatory processes, such as arthritis, multiple sclerosis and allergy. VLA-4 mediates cell adhesion to VCAM-1 and to the CS-1 segment of fibronectin (CS-1/FN).

The integrin α4 subunit can also associate with the β7 subunit to form the α4β7 heterodimer, which is mainly expressed on leukocytes and plays key roles in lymphocyte homing to the intestine and associated lymphoid tissue, such as Peyer's patches. The mucosal vascular addressin MAdCAM-1 is the main α4β7 ligand mediating lymphocyte homing to Peyer's patch high endothelial venules (HEV). α4β7 can also interact with CS-1/FN and VCAM-1,

celular a MAdCAM-1, una molécula expresada en la membrana de células endoteliales, así como a CS-1/FN y VCAM-1.

Con el fin de identificar dominios en la subunidad α4 que participan en la interacción con ligandos de VLA-4 y α4β7, hemos modificado determinados residuos en α4 mediante mutagénesis dirigida en el cDNA de α4. El efecto de las mutaciones introducidas en la función de estas integrinas se ha analizado mediante ensayos de adhesión de células transfectadas con las distintas mutaciones, habiéndose identificado varios residuos importantes en la adhesión a CS-1/FN y MAdCAM-1, así como residuos cruciales en la conformación de VLA-4.

Análisis del papel funcional de VLA-4 en el desarrollo del mieloma múltiple

El mieloma múltiple es un neoplasma progresivo caracterizado por la acumulación de células plasmáticas malignas en la médula ósea. Estas células están en íntimo contacto con las células estromales a través de interacciones entre diferentes receptores con sus ligandos. La adhesión de células de mieloma al estroma conlleva la producción de IL-6, la cual es esencial para la proliferación y la supervivencia de las células de mieloma. Estas células expresan VLA-4, la cual media adhesiones celulares de éstas con las células estromales del mieloma. Asimismo se ha sugerido que esta adhesión causa un incremento en la síntesis de IL-6 por parte de las células estromales. El objetivo de nuestros estudios ha consistido es caracterizar las interacciones entre VLA-4 de las células plasmáticas con fibronectina y VCAM-1 purificados, así como analizar el potencial de estas interacciones de ser moduladas por diferentes estímulos.

Caracterización estructural y funcional del sistema de receptores para TGF-ß1 en células estromales de médula ósea.

Las células estromales de la médula ósea juegan una importante función reguladora en el mantenimiento, proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.

To identify domains on the α4 subunit which are involved in VLA-4 and α4β7 interaction with their ligands, we have modified selected residues on a4 by site-directed mutagenesis of the α4 cDNA. The effects of the mutations in VLA-4 and α4β7 function have been analyzed by cell adhesion assays using transfected cells containing the selected mutations on α4. We have identified several important residues for cell adhesion to CS-1/FN and MAdCAM-1, as well as key residues for mantaining a proper VLA-4 conformation.

Analysis of functional involvment of VLA-4 in multiple myeloma.

Multiple myeloma is a progresive neoplasma which is characterized by the accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow. These cells are in close association with stromal cells through the interaction of different adhesion receptors with their ligands. Myeloma cell adhesion to MM stroma has been shown to trigger IL-6 production. This cytokine is implicated in the proliferation and survival of myeloma cells. VLA-4 is expressed by myeloma cells and mediates adhesion between these cells and the stroma. In addition it has been suggested that this adhesion mediates the triggering of IL-6 by stromal cells. One of our goals has been the characterization of myeloma cell adhesion to purified VLA-4 ligands, fibronectin and VCAM-1, as well as potential modulatory mechanisms implicated in this adhesion.

Structural and functional characterization of the TGF-ß1 receptor system expressed by human bone marrow stromal cells.

The bone marrow stromal cells play a key regulatory role in the maintainance, proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors. Hematopoiesis is balanced by the action of inhibitory and stimulatory molecules. TGF-ß has a inhibitory action specially on the most primitive progenitors, and it is present in the bone marrow microenvironment mainly secreted by megakaryocytes and stromal cells. Given that the stromal cells are essential during hematopoiesis and the important modulatory role of TGF-ß in this process, we have characterized the TGF-ß receptor system on these cells, as well as the structural associations among these receptors.

La hematopoyesis está controlada por la acción de moléculas moduladoras que inhiben o estimulan dicho proceso. TGF-ß ejerce una acción inhibidora especialmente sobre los progenitores más primitivos, y se encuentra en el microambiente de la médula ósea, secretada principalmente por megacariocitos y por células estromales. Dado que las células estromales son absolutamente esenciales durante la hematopoyesis, y dado el importante papel modulador de TGF-ß en este proceso, hemos caracterizado el sistema de receptores para esta citoquina en estas células, así como las asociaciones estructurales entre estos receptores.

Para investigar si la acción de TGF-ß sobre las células estromales puede influenciar la adhesión de progenitores y células leucémicas al estroma, se llevaron a cabo experimentos de adhesión entre líneas celulares progenitoras y de mieloma con estroma de médula ósea, incubado en ausencia y en presencia de TGF-ß. Los resultados mostraron que esta citoquina regula la producción de fibronectina por las células estromales, lo cual se traduce en una utilización diferencial de las integrinas VLA-4 y VLA-5 para mediar la adhesión entre progenitores y células de mieloma con el estroma.

To investigate if TGF-ß action on stromal cells can influence the adhesion of progenitor and leukemic cells to stroma, we carried out adhesion assays between progenitor and myeloma cell lines with the stroma, incubated in the absence and in the presence of TGF-ß. The results showed that this cytokine regulates fibronectin production by stromal cells, which causes a differential utilization of VLA-4 and VLA-5 integrins to mediate the adhesion of progenitors and myeloma cells with the stroma.

Proyectos Financiados/*Funding Agencies*

— DGICYT, PM95-0017 (1996-1999).

— Fundación Areces (1995-1997).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **María Luisa Muñoz Gómez** Identificación de regiones funcionales en la subunidad α4 de la integrina VLA-4. Universidad Autónoma de Madrid, 1997. Director: J. Teixidó.

— **Mª Mar Robledo López.** Caracterización estructural y funcional de los receptores de TGF-ß1 en células estromales de médula ósea y en la línea celular megacarioblástica UT-7. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Director: J. Teixidó.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Muñoz, M., Serrador, J., Nieto, M., Luque, A., Sánchez-Madrid, F., and Teixidó J. (1997). A novel region of the α4 integrin subunit with a modulatory role in VLA-4- mediated cell adhesion to fibronectin. Biochem. J. *327*, 727-733.

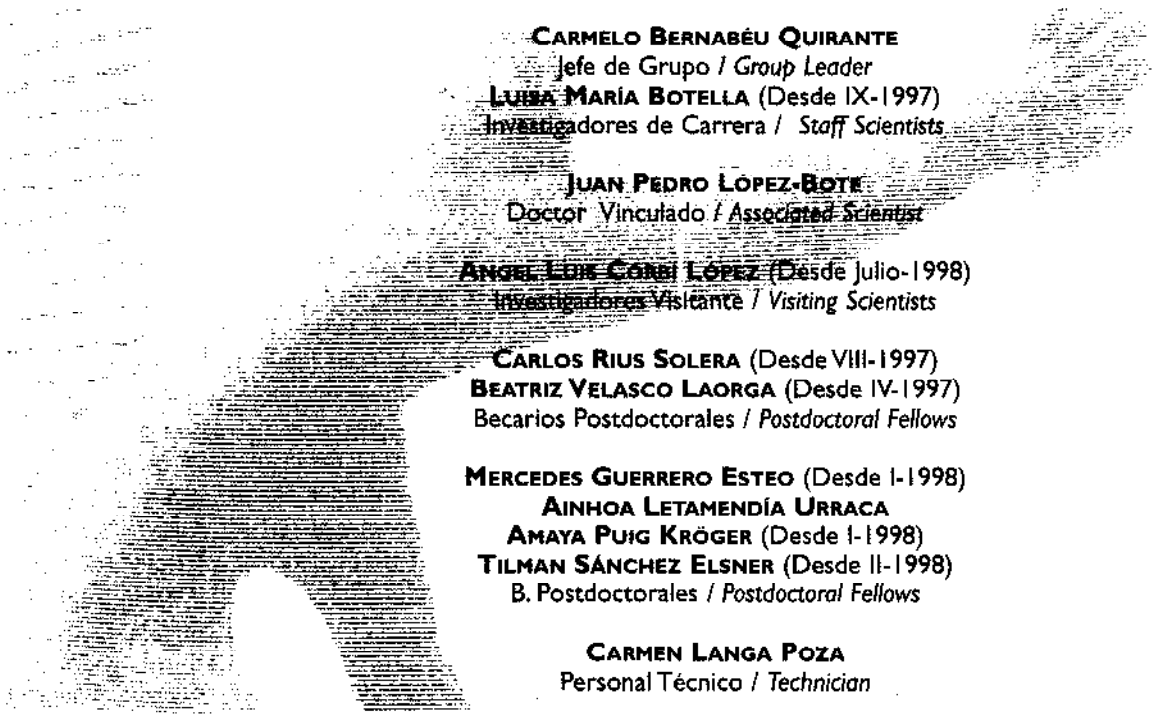
— Teixidó, J., and Robledo, M.M. (1997). TGF-ß1 receptors on human bone marrow stromal cells. Leukem. Lymph. *27*, 509-515.

— Robledo, M.M., Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A., and Teixidó, J. (1998). Differential use of VLA-4 and VLA-5 integrins by hematopoietic precursors and myeloma cells to adhere to TGF-ß1-treated bone marrow stroma. J. Biol. Chem. *273*, 12056-12060.

— Robledo, M.M., Ursa, M.A., Sánchez-Madrid, F., and Teixidó, J. (1998). Associations between TGF-ß1 receptors in human bone marrow stromal cells. Br. J. Haematol. *102*, 804-811.

— Guerrero-Esteo, M., Ruiz-Velasco, N., Muñoz, M., and Teixidó, J. (1998) Role of two conserved glycine residues in the ß-propeller domain of the integrin α4 subunit in VLA-4 conformation and function. FEBS Letters *429*, 123-128.

Receptores de Membrana
Membrane Receptors



Carmelo Bernabéu Quirante
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Luisa María Botella (Desde IX-1997)
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Juan Pedro López-Botet
Doctor Vinculado / *Associated Scientist*

Angel Luis Corbí López (Desde Julio-1998)
Investigadores Visitante / *Visiting Scientists*

Carlos Rius Solera (Desde VIII-1997)
Beatriz Velasco Laorga (Desde IV-1997)
Becarios Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Mercedes Guerrero Esteo (Desde I-1998)
Ainhoa Letamendía Urraca
Amaya Puig Kröger (Desde I-1998)
Tilman Sánchez Elsner (Desde II-1998)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Carmen Langa Poza
Personal Técnico / *Technician*

Palabras clave: Endoglina, células endoteliales, TGF-β, receptores, HHT.

Endoglina (CD105) es una proteína de membrana presente en células endoteliales, macrófagos y algunos tipos de fibroblastos. Funcionalmente, endoglina es un componente del sistema de receptores de membrana del TGF-β y es capaz de modular las respuestas celulares a dicho ligando. Durante los últimos dos años, hemos analizado la expresión y función de esta proteína y en particular su relación con el factor TGF-β.

Endoglina (CD105) es un componente del complejo receptor del TGF-β que se expresa abundantemente en la superficie de células endoteliales. Mutaciones en el gen de endoglina son responsables de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1 (HHT1), también conocida como síndrome

Keywords: Endoglin, endothelial cells, TGF-β, receptors, HHT.

Endoglin (CD105) is a cell surface component of the TGF-β receptor complex highly expressed by endothelial cells. Mutations in the endoglin gene are responsible for the Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia type 1 (HHT1), also known as Osler-Weber-Rendu syndrome (OMIM 187300). This is an autosomal dominant vascular disorder probably caused by a haploinsufficiency mechanism. To understand the mechanisms underlying the regulated expression of endoglin, a genomic DNA clone containing 3.3-kb of the 5'-flanking sequence of the human endoglin gene has been isolated. The 5'-flanking region of the endoglin gene lacks consensus TATA and CAAT boxes, but contains two GC-rich regions and consensus motifs for Sp1, ets, GATA, AP-2, NFkB, and Mad, as well as TGF-β-, glucocorticoid-, vitamin D- and estrogen-responsive elements. As determined by pri-

de Osler Weber-Rendu (OMIM 187300). Esta es una enfermedad autosómica dominante que afecta al sistema vascular y que es causada por un mecanismo de haploinsuficiencia. Con objeto de comprender los mecanismos de la expresión regulada de endoglina, se aisló un clon de DNA genómico conteniendo 33-kb de la secuencia flanqueante en 5´ del gen de endoglina humana. La región flanqueante en 5´ del gen de endoglina carece de cajas consenso TATA y CAAT, pero contiene dos regiones ricas en GC-rich y secuencias consenso para Sp1, ets, GATA, AP-2, NFkB, y Mad, así como elementos de respuesta a TGF-β, glucocorticoides, vitamina D y estrógenos. Mediante experimentos de *primer extension* y 5´-*RACE*, se localizó un conjunto de sitios de inicio de la transcripción 350-bp más arriba del codon de inicio de la traducción. Para analizar la actividad del promotor de endoglina, el fragmento -400/+341 se fusionó al gen de la luciferasa, y se llevaron a cabo transfecciones transitorias en varios tipos celulares. Esta construcción mostró una actividad específica de tejido en células endoteliales humanas y bovinas. El análisis de varias construcciones truncadas reveló la existencia de un promotor basal dentro del fragmento -81/+350, así como elementos reguladores importantes dentro del fragmento -400/-141. Ensayos de movilidad electroforética demostraron la interacción específica de un miembro de la familia ets con una secuencia consenso localizada en -68. Una construcción del promotor mutado en esta secuencia ets mostró una actividad mucho más reducida que la de la construcción control, lo que apoya la implicación de este sitio ets en la actividad basal del promotor. El promotor de endoglina mostró inducibilidad en presencia del TGF-β1, lo que sugiere posibles tratamientos terapéuticos en los pacientes de HHT1, donde los niveles de expresión del alelo normal de endoglina no alcanzan el nivel mínimo requerido para su función.

Además, también hemos analizado la función de endoglina. Endoglina comparte con betaglicano una homología limitada de secuencia y el ser componentes del complejo receptor de TGF-β. Utilizando mioblastos de rata como sistema modelo, hemos encontrado que la sobre-expresión de endoglina conduce a una respuesta disminuida a TGF-β en la inhibición del crecimiento celular y en la síntesis del inhibidor tipo 1 del

mer extension and 5´ RACE experiments, a cluster of transcriptional start sites was found to be located 350-bp upstream from the translation initiation codon. To analyze the endoglin promoter activity, the upstream -400/+341 fragment was fused to the luciferase gene and transient transfections were conducted in several cell types. This construct displayed a tissue specific activity in human and bovine endothelial cells. Analysis of various deletion constructs revealed the existence of a basal promoter region within the -81/+350 fragment as well as major transcriptional regulatory elements within the -400/-141 fragment. Electrophoretic mobility shift assays demonstrated the specific interaction of a member of the ets family with a consensus motif located at position -68. A promoter construct mutated at this ets sequence showed a much reduced activity as compared to the wild type construct, supporting the involvement of this ets motif in the basal activity of the promoter. The endoglin promoter exhibited inducibility in the presence of TGF-β1, suggesting possible therapeutic treatments in HHT1 patients, where the expression level of the normal endoglin allele might not reach the threshold required for its function.

We have also analyzed the function of endoglin. Endoglin shares with betaglycan a limited amino acid sequence homology and being components of the membrane TGF-β receptor complex. Using rat myoblasts as a model system, we found that overexpression of endoglin led to a decreased TGF-β response to cellular growth inhibition and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) synthesis, whereas overexpression of betaglycan resulted in an enhanced response to inhibition of cellular proliferation and PAI-1 induced expression in the presence of TGF-β. The regulation by endoglin of TGF-β responses seems to reside on the extracellular domain, as evidenced by the functional analysis of two chimeric proteins containing different combinations of endoglin and betaglycan domains. Binding studies with ^{125}I-TGF-β1 demonstrated that betaglycan expressing cells displayed a clear increase (about 3.5-fold), whereas endoglin expressing cells, only displayed an slight increment (about 1.6-fold) in ligand binding respect to mock transfectants. SDS-PAGE analysis of radiolabeled receptors demonstrated that expression of endoglin or betaglycan is associated with an increased TGF-β binding to the signaling receptor complex; however, while endoglin increased binding to

plasminógeno (PAI-1), mientras que la sobre-expresión de betaglicano resultó en una respuesta aumentada a la inhibición de la proliferación celular y en la inducción de la expresión de PAI-1 en presencia de TGF-β. La regulación por endoglina de las respuestas a TGF-β parece residir en el dominio extracelular, tal como demuestra el análisis funcional de dos proteínas quiméras que contienen distintas combinaciones de los dominios de endoglina y betaglicano. Estudios de unión de ^{125}I-TGF-β1 demostraron que las células que expresan betaglicano aumentan aproximadamente 35-veces la unión de ligando respecto a transfectantes control, mientras que las células que expresan endoglina, sólo muestran un ligero aumento (aproximadamente 16-veces). Análisis mediante SDS-PAGE de los receptores radiomarcados demostraron que la expresión de endoglina o betaglicano está asociada con un aumento de la unión de TGF-β a los receptores señalizadores; sin embargo, mientras endoglina aumentaba la unión a los receptores tipos I y II, betaglicano aumentaba la unión al receptor tipo II. Por otro lado, encontramos que la unión de TGF-β a endoglina requiere la presencia del receptor tipo II, tal como se demuestra mediante transfecciones transitorias en células COS. Estos resultados sugieren que en las respuestas al TGF-β, endoglina tiene un papel distinto al de betaglicano.

types I and II receptors, betaglycan increased the binding to the type II receptor. Conversely, we found that TGF-β binding to endoglin required the presence of receptor type II as evidenced by transient transfections experiments in COS cells. These findings suggest a role for endoglin in TGF-β responses distinct from that of betaglycan.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 08.1/0022/1997 (1997-1998).
— CICYT, SAF94-0791 (1994-1997).
— CICYT, SAF97-0034 (1997-2000).
— CICYT, SAF98-0068, EC, PL950995 (1996-1998).

Tesinas de Licenciatura/*Master Theses*

— **Amaya Puig Kröger.** Estudio de la funcionalidad de NF-kB en la actividad del promotor de PECAM-1/CD31. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Directora: L.M. Botella.

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Nuria Almendro Motos.** Bases moleculares que regulan la expresión de PECAM-1/CD31. Caracterización estructural y funcional de su región promotora. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Director: C. Bernabeu Quirante.

Patentes/*Patents*

— Letarte, M., Massagué, J., Bernabéu, C. y Cheifetz, S. (1998). Use of endoglin polypeptides for modifying the regulatory activity of TGF-ß. Número de Patente: 5,719,120. Oficina de Patentes de Estados Unidos.

— Letarte, M., Massagué, J., Bernabéu, C. y Cheifetz, S. (1998). Soluble TGF-β-Binding endoglin polypeptides and homodimers. Número de Patente: 5.830.847. Oficina de Patentes de Estados Unidos.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Bernabéu, C., Juan, M., López-Botet, M., Pizcueta, P., Vilardel, C., Vilella, R. y Engel, P. (1997). Informe del VI taller internacional de antígenos de diferenciación de leucocitos humanos (Kobe 1996). Inmunología *16*, 55-62.

— Corbí-López, A., Raab, U., and Bernabéu-Quirante, C. (1997). Recirculación de celulas inmunitarias y sus mecanismos de localización en distintos lugares anatómicos. Medicine *7*, 2216-2223.

— López-Rodríguez, C., Botella, L., and Corbi, A.L. (1997). CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) regulate the tissue specific activity of the CD11c integrin gene promoter through functional interactions with Sp1 proteins. J. Biol. Chem. *272*, 29120-29126.

— Luque, A., Cabañas, C., Raab, U., Letamendía, A., Páez, E., Herreros, L., Sánchez-Madrid, F., and Bernabéu, C. (1997). The use of recombinant vaccinia virus to generate monoclonal antibodies against the cell surface glycoprotein endoglin. FEBS Lett. *413*, 265-268.

— Penalva, L.O., Orlando, T.C., Soares, M.A., Yokosawa, J., Stoker, A., Botella, L.M., and Lara, F.J. (1997). Molecular characterization of the C3 DNA-puff gene of *Rhynchosciana americana*. Gene *193*, 173-192.

— Letamendía, A., Lastres, P., Almendro, N., Raab, U., Bühring, J., Kumar, S., and Bernabéu, C. (1998). Endoglin, a component of the TGF-β receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells. Int. J. Cancer. *76*, 547-551.

— Letamendía, A., Lastres, P., Botella, L.M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L., and Bernabéu, C. (1998). Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-β. A comparative study with betaglycan. J. Biol. Chem. *273*, 33011-33019.

— Li, C.G., Wilson, P.B., Kumar, S., Bernabéu, C., Raab, U., and Wang, J.M. (1998). Immunodetection and characterization of soluble CD105-TGF-β complexes. J. Immunol. Methods *218*, 85-93.

— Rius, C., Smith, J.D., Almendro, N., Langa, C., Botella, L.M., Marchuk, D.A., Vary, C.P.H., and Bernabéu, C. (1998). Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type I. Blood *92*, 4677-4690.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Raab, U., Langa, C., Letamendía, A., Lastres, P., Páez, E., and Bernabéu, C. (1997). Characterization of anti-CD105 monoclonal antibodies using recombinant vaccinia virus. In Leucocyte Typing VI. Kishimoto, T., Kikutani, H., Kr. von dem Borne, A.E.G., Goyert, S.M., Mason, D.Y., Miyasaka, M., Moretta, L., Okumura, K., Shaw, S., Springer, T.A., Sugamura, K., and Zola, H., eds. (Garland Publishing Inc., New York) pp. 708-709.

— Letarte, M., Bourdeau, A., Vera, S., Pece, N., Greaves, A., Dignat-George, F., Mutin, M., Kraling, B., Linask, K., O'Brien, E., Labinaz, M., Ross, J., Parish, C., and Bernabéu, C. (1997). CD105 Workshop panel report. In Leucocyte Typing VI. Kishimoto, T., Kikutani, H., Kr. von dem Borne, A.E.G., Goyert, S.M., Mason, D.Y., Miyasaka, M., Moretta, L., Okumura, K., Shaw, S., Springer, T.A., Sugamura, K., and Zola, H., eds. (Garland Publishing Inc., New York) pp. 703-708.

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 (Desde II-1998)
Laura Sanz Alcover (Desde IX-1998)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral fellows*

Ana Gutiérrez del Arroyo Valenciano
Mª Carmen de Marco (Hasta VII-1998)
Cristina Gil Lamaignere (Hasta XI-1998)
Jorge Gamonal Aravena (Desde IX-1998)
Olga Jorge Torres (Desde XI-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Student*

Juana María López Vera
Personal Técnico / *Technician*

La apoptosis o muerte programada es un mecanismo de suicidio celular controlado genéticamente. Las células mueren por apoptosis como parte del proceso normal del desarrollo y mantenimiento de los tejidos.

I. Papel del p53 en la resistencia de líneas celulares a irradiación. Regulación de Fas/FasL

Las radiaciones ionizantes originan daños en el DNA y son potentes inductores de la apoptosis. Estos tratamientos también inducen una fuerte activación de p53. En trabajos previos utilizando células derivadas de ratones p53-nulos hemos demostrado que p53 no es necesario para regular la apoptosis inducida tras la retirada de IL-3, ni tampoco es necesaria para rescatar las células con IL3 tras su irradiación. Adicionalmente observamos que los rayos X inducen un fuerte incremento en la expresion de Fas, que es dependiente de p53. La muerte por retirada de IL3 no induce

Apoptosis or programmed cell death is a genetically controlled mechanism of cell suicide. Cells undergo apoptosis as part of the normal processes of development and maintenance of complex tissues.

I. Role of p53 in the resistance of cell lines and tumors to cancer therapy

Ionizing radiation is a potent inducer of apoptosis which is also able to increase the levels of p53. In our previous work, we have shown that p53 is not required for the regulation of apoptosis after growth factor deprivation, nor was it required for the rescue of cells by growth factors following DNA damage. Moreover, X-irradiation induced a significant increase of Fas surface expression that is also p53-dependent. IL3 removal itself does not increase Fas expression, however, an earlier Fas induction is observed in irradiated cells in the absence of IL3.

incremento en la expresión de Fas; sin embargo sin IL3, la inducción de Fas por irradiación es mas rápida. Por lo tanto la IL3 modularía el grado de expresión de Fas.

II. Mutaciones de p53 como herramientas para definir sus funciones

p53 es un proteína bien caracterizada y con múltiples funciones. Determinadas mutaciones de p53 se han asociado con su diferente actividad biológica. En dos líneas tumorales de cáncer de mama con mutaciones de p53 en la zona de unión al DNA observamos que ciertos efectos mediados de p53 estaban diferentemente alterados. Esta primera aproximación nos permite localizar funciones con mutaciones específicas y ha creado el marco para el estudio de nuevas mutaciones "naturales o inducidas" y su aportación a las diferentes actividades de la molécula. Utilizando mutagénesis dirigida localizaremos zonas determinadas de p53 y analizaremos su actividad sobre células p53-nulas.

III. Implicación de los mecanismos de reparación del DNA en la capacidad de algunos factores de proliferación de rescatar células tras daño en su DNA

Muchos agentes usados en terapia anticancerosa causan daños en el DNA. Se sabe que determinados mecanismos de reparación del DNA pueden estar implicados en la regulación de la apoptosis. Una de las líneas de investigación consiste en estudiar la apoptosis inducida tras daño al DNA en cultivos primarios de medula ósea de ratones con defecto en su capacidad de reparar el DNA. Tal es el caso de los ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) y cuyo defecto se ha asociado a una mutación del gen de la subunidad catalítica de la proteína DNA-proteína kinasa (DNA-PKcs). La mutación de la DNAPKcs no permite la reparación de las roturas de doble cadena de DNA. Además de los ratones SCID, utilizaremos ratones con el knockout de la DNA-PKcs. El papel que juegan los mecanismos de reparación en la activación de la apoptosis tendrá importantes consecuencias en la elección de la terapia a utilizar.

II. p53 mutants, tools for the analysis of p53 functions

p53 is a well characterised protein with multiple functions. Certain p53 mutations have been associated with specific biological activities. In two breast tumour cell lines containing point mutations in the DNA binding region we observed different activity patterns. Our aim is to generate mutants p53 by site directmutagenesis in order to evaluate their effect on cell cycle regulation, drug resistance and apoptosis, when reintroduced into other cell types.

III. Involvement of DNA repair mechanisms in the ability of IL-3 to rescue haematopoietic cell lines from DNA damage

It is well known that many therapeutic agents cause DNA damage, therefore, the study of the regulatory role of DNA repair mechanisms in apoptosis is of significant interest. Animals deficient in certain DNA repair mechanisms may provide valuable information about the implication of these mechanisms in the control of apoptosis as well as their role in the rescuing ability mediated by surviving factors. Severe combine immunodeficient (scid) mice present a mutation which has been recently localized in the catalytic subunit of (DNA-PK), a protein complex involved in double strand DNA repair. Immune deficiency of scid mice was the consequence of an inability to undergo effective V(D)J recombination and lack of mature T and B cells. As an alternative model we will also work with DNA-PKcs-null mice generated by genetic recombination. The role of DNA repair mechanisms in the activation of apoptosis should be considered when selecting a specific therapy.

IV. Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)

Our work deals with the role of bcl-2 on the survival capacity of the B-CLL cells. These leukemia cells have increased levels of bcl-2 which correlate with their apoptotic resistance. We demonstrated the presence of high levels of bcl-2 protein along several days in culture. Moreover, a RNA protection assay was performed to analyze variations in mRNA levels of bcl-2, bcl-X, bax, bad, bik, mcl-1 and bfl-1. A parallel analysis of the respiratory activity of mitochondria was done with specific dyes JC-1 and Dioc6.

IV. Apoptosis en la Leucemia Linfoide crónica de células B (LLC-B)

Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio del bcl-2 en la supervivencia de las células LLC-B. Estas células tienen niveles elevados de bcl-2, que se han correlacionado con su resistencia a la apoptosis. Hemos comprobado la presencia de altos niveles de bcl-2, a lo largo de varios días en cultivo "*in vivo*". Además estudiamos los cambios de mRNA de bcl-2, bcl-W, bcl-XL, mcl-1, bax, bad, y bak mediante un ensayo de protección frente a RNAsas. En paralelo se esta estudiando la asociación con la actividad respiratoria de la células mediante citofluorimetría al marcar las mitocondria con colorantes específicos Dioc6 y JC-1. Utilizando sondas especificas y mediante el ensayo de protección de RNAsas analizaremos la presencia de caspasas en las células de LLC-B, y su posible implicación en la resistencia de estas células a la muerte por apoptosis. También estudiamos los mecanismos de degradación del DNA en las LLC-B analizando la actividad endonucleasa-dependiente de caspasas mediante RT-PCR.

V. Modelo de destrucción tisular por apoptosis: La periodontitis destructiva

La enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa crónica que se caracteriza por el desarrollo de un proceso destructivo inflamatorio crónico que afecta los tejidos de inserción del diente, produciéndose la reabsorción de hueso alveolar, la formación de sacos periodontales y la eventual pérdida del diente. Creemos que el estudio de la periodontitis destructiva constituye un buen modelo experimental *in vivo* de apoptosis. Según nuestra hipótesis debe existir una correlación entre la presencia de estas citoquinas y tipos celulares en fluido gingival crevicular y en biopsias de tejido conectivo gingival con la inducción de la apoptosis y/o necrosis responsable de la progresión de la periodontitis destructiva.

Furthermore, we will analyze mRNA levels of caspases after in vitro *cultures of B-CLL and their implication in the onset of apoptosis. Finally, we are currently engaged in evaluating the caspase-dependent nuclease activity present in B-CLL.*

V. A model for tissue destruction by apoptosis: Active periodontitis

*Periodontal disease is a chronical infectious pathology characterized by the activation of destructive and inflammatory processes, affecting the teeth insertion, producing re-absorption of the alveolar bone, formation of periodontal pockets and eventually the loss of the teeth. We believe that periodontal disease is an interesting "*in vivo*" model of apoptosis in which the levels of inflammatory citokines, chemokines and cell components will be correlated with the induction of soft tissue destruction by apoptosis or necrosis.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— Almirall-Prodesfarma, (6/1996-6/1998).

— CAM, 07/029/1996 (1997).

— CAM, 08.1/0012/1997 (1997-1999).

— CICYT, SAF97-0064-C03-03 (1997-2000).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Gómez, J., García, A., R.-Borlado, L., Bonay, P., Martínez-A, C., Silva, A., Fresno, M., Carrera, A.C., Eicher-Streiber C., and Rebollo, A. (1997). IL-2 signaling controls actin organization through Rho-like protein family, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C-z. J. Immunol. *158*, 1516-1522.

— Lamas, M., Rey-Campos, J., and Silva, A. (1997). Identification of a novel glucocorticoid response unit (GRU) in the 5'-flanking region of the mouse IL2 receptor gene. Cytokine. 9 (12), 973-981.

— Ramírez, F., and Silva A.G. (1997). Glucocorticoids enhanced ConA induced mitogenic responses through the inhibition of nitric oxide production. Immunol. *90*, 66-73.

— Silva, A., Wyllie A., and Collins, M.K. (1997) p53 is not required for regulation of apoptosis or radioprotection by IL-3. Blood. *89*, 2717.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Ramírez, F y Silva, A. (1997). Linfocitos T. En, Introducción a la inmunología humana. Sánchez-Pérez, M., ed. (Madrid: Editorial Síntesis) pp. 303-337.

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
B. Predoctoral / *Graduate Student*

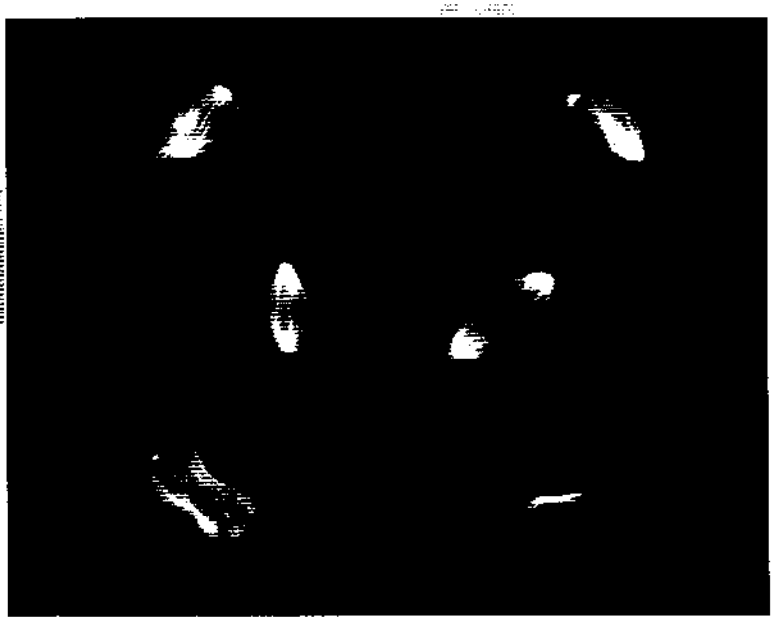


Figura: Visualización directa al microscopio de fluorescencia, de microtúbulos en las distintas etapas de mitosis de celulas PtK2 con Flutax, un derivado fluorescente de taxol.

Figure: *Microtubules directly imaged under the fluorescence microscope with the fluorescent taxol derivative Flutax, during different stages of mitosis in PtK2 cells.*

Palabras clave: Taxol, microtúbulos, células tumorales, microscopía de fluorescencia.

Keywords: Taxol, microtubules, tumor cells, fluorescence microscopy.

Taxol (paclitaxel) es un potente agente antitumoral que inhibe la dinámica normal de microtúbulos y la división celular, y un inductor del ensamblaje de tubulina. Las dianas primarias de taxol y los procesos por los que desencadena la muerte celular no son bien conocidos. Empleando una familia de derivados fluorescentes activos de taxol que se unen específicamente a microtúbulos, hemos caracterizado las dianas subcelulares de este fármaco en líneas de leucemia humana y en carcinomas de mama y ovario.

Flutax (7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanil] taxol) a concentraciones micromolares proporciona una visualización

Taxol (paclitaxel) is a potent antitumor agent that inhibits normal microtubule dynamics and cell division and induces tubulin assembly. The primary targets of taxol and the mechanisms by which cell death is triggered are not well known. Employing a family of active fluorescent derivatives of taxol that bind specifically to microtubules we have characterized the subcellular targets of this drug in human leukemic cell lines, breast and ovary carcinomas.

Micromolar Flutax (7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl]taxol) concentrations give a direct, rapid and accurate visualization, with an advantage over immunofluorescence of

directa, rápida y precisa, con ventajas sobre la inmunofluorescencia, de microtúbulos citoplásmicos y del huso mitótico, nativos ó fijados suavemente, en una variedad de células permeabilizadas. Además, Flutax marca el centrosoma de células PtK2 mas intensamente que los anticuerpos frente a α y β tubulina, y co-localiza con anticuerpos frente γ-tubulina. Flutax marca fuertemente los microtúbulos cercanos a los polos del huso, así como los microtúbulos en el ecuador del huso mitótico telofásico y el cuerpo intermedio en citoquinesis, sugiriendo una interacción predominante con las zonas en las que la tubulina se polimeriza de nuevo.

La incubación de células U937 en crecimiento con concentraciones nanomolares de Flutax permite la visualización directa de centrosomas, los polos del huso en profase, los husos en metafase, anafase y el cuerpo medio en citoquinesis. Sin embargo, a concentraciones ligeramente mas altas, la unión específica de Flutax a una fracción del total de los sitios de unión celulares inhibe efectivamente la división de células leucemicas U937, K562, el carcinoma de cervix HeLa, los carcinomas de mama MCF-7 y HsT578 y de ovario OVCAR-3 en G_2/M e induce la muerte por apoptosis desde este punto de control o después de la salida de mitosis sin división celular. Los centrosomas y el ensamblaje de microtúbulos desde el polo al cinetócoro en el huso mitótico constituyen las dianas primarias de la unión de taxoide en estas células.

native or mildly fixed citoplasmic and mitotic spindle microtubules in a variety of permeabilized cells. In addition, Flutax labels the centrosome in PtK2 cells more intensely than the antibodies to α and β-tubulin and co-localizing with anti γ-tubulin antibodies. Flutax strongly labels microtubules near the spindle poles as well as the microtubules at the telophase spindle equator and the midbody in cytokinesis, suggesting a predominant interaction of Flutax with the sites at which tubulin is newly polymerized.

Treatment of growing U937 cells with nanomolar concentrations of Flutax, permits specific imaging of centrosomes in interphase cells, the spindle pole in prophase, the two half-spindles in metaphase, anaphase and midbodies in cytokinesis. However, at slightly higher doses, specific binding of Flutax to a fraction of the cellular binding sites effectively arrests division of leukemic cells U937 and K562, HeLa cervix carcinoma, breast carcinomas MCF-7 and HsT578 and ovary carcinoma OVCAR -3 in G_2/M, and induces death by apoptosis from this control point or after mitosis exit without cell division. The centrosome and the assembly of microtubules from the pole to the kinetochore in the mitotic spindle are primary targets of taxoid binding in these cells.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*
— DGICYT, PB95-0116 (1996-1999).
— DGICYT, PB95-0078-C02-01 (1996-1999).
— Fundación Científica de la Sociedad Española contra el Cáncer (1996-1998).

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

— Mollinedo, F., Fontán, G., Barasoain, I., and Lazo, P. (1997). Recurrent infections in CD53 deficiency. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4, 229-231.
— Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuña, A.U., Amat-Guerri, F., and Andreu, J.M. (1998). Fluorescent taxoids as probes of the microtubule cytoskeleton. Cell Motil. Cytoskel. 39, 73-90 y portada.
— Jiménez- Barbero, J.M, Souto, A.A., Abal, M., Barasoain, I., Evangelio, J.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., and Amat-Guerri, F. (1998). Effect of 2'-OH acetylation on the bioactivity and conformation of 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl]taxol. A NMR-fluorescence microscopy study. Biorg. Med. Chem. 6, 1857-1863.
— Chau, M-F, Radeke, M. J., De Inés, C., Barasoain, L., Kohlstaedt, L.A., and Feinstein S. C. (1998). The microtubule associated protein tau cross-links to two distinct sites each a and b tubulin monomer via separate domains. Biochemistry 37, 17692-17703.

Diferenciación de Linfocitos Humanos
Receptors Driving Human Lymphocyte Development

Antonio de la Hera Martinez
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Concepcion Revilla Calvo (Desde V-1997)
Paloma Sánchez Aparicio (Desde XII-1997)
Eva Sanz Merino
Investigadoras Contratadas / *Research Associate*

Winston Andrade Lillo (Hasta I-1998)
Gemma Fernández Miguel (Hasta VII-1998)
Veronica Parrilllas Horche (Desde X-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Palabras clave: Celulas T y B, complejo TCR/CD3, suplantador de cadenas ligeras, animales genéticamente modificados, estequiometría.

Parte del trabajo aqui referido se realizó en proyectos Coordinados con los Doctores Eva Sanz y Álvarez de Mon (Universidad de Alcalá), y colaboraciones con los Doctores Kappes (Fox Chase Cancer Institute, Filadelfia) y Rawlings (Universidad de California, Los Angeles), 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 antigeno 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 puedan transducir señales en linfocitos totalmente diferenciados.

Keywords: T and B cells, TCR/CD3 complex, immunoglobulin surrogate receptors, genetically modified mice, steichiometry.

This work was partially done as a Coordinated Project with Drs. Sanz and Alvarez de Mon (Alcalá University) and collaborations with Drs. Kappes (Fox Chase Cancer Institute, Philadelphia) and Rawlings (UCLA). 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 regu-

Las subunidades se agrupan en diversos heterodímeros de proteínas con funciones de reconocimiento de ligando o transdución de señales. Las subunidades de los complejos receptores 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 prereceptores, 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 CD3εδ funciones distintas del módulo CD3εγ?

Nuestros resultados indican que, contrariamente a lo que se pensaba hasta ahora, CD3δ no es ni estructuralmente esencial para el transporte de complejosTCR/CD3 a la superficie de las células T, ni funcionalmente redundante con la subunidad homóloga CD3γ. Utilizando animales genéticamente modificados y anticuerpos específicos de subunidad CD3 hemos contribuido a demostrar que CD3δ es prescindible para el desarrollo de las células Tγδ y la señalización que ejecuta el pre-receptor ψαβTCR/CD3 para controlar el primer punto de control en el desarrollo de las células pre-Tαβ. En contraste la función de CD3δ es clave a la hora de controlar los procesos de señalización en el segundo punto de control, el que monitoriza la génesis de células T maduras cooperadoras $CD4^+$ o citotóxicas $CD8^+$.

Por otra parte, hemos contribuido a establecer un sistema de diferenciación *in vitro* de células productoras de anticuerpos a partir de células madre de la sangre totipotenciales $CD34^+CD38^-$ y una linea de estroma de médula osea, como parte de nuestra estrategia de estudiar los mecanismos celula-

late lymphocyte development prior to the expression of the complete set of subunits which occurs in an ordered fashion. The occurrence of subrogate subunits for the yet missing allows for 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 CD3εδ parallel transduction module have unique functions which are non redundant to those of the CD3εγ module?.

Our results show thatCD3δ is neither structurally essential for the surface expression of TCR/CD3 complexes in T cells nor functionally redundant with the homologous CD3γ subunit. Using transgenic and knock-out mice and subunit specific antibodies we have contributed to demonstrate that CD3δ is not essential for the development of Tγδ cells or the signaling by the ψαβTCR/CD3 pre-receptor that monitor the successful differentiation of pre-Tαβ cells at the first developmental check point. However, CD3δ is essential for the efficient progress through the second development check point, where the generation of mature $CD4^+$ helper or $CD8^+$ cytotoxic mature T cells occurs.

We have also contributed to establish 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. 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.

Finally, we have established the that TCR that Tαβ 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.

res que controlan el desarrollo de los linfocitos B, y caracterizar los estadios de diferenciación B, su frecuencia, distribución anátomica y variación con la edad.

Finalmente, hemos establecido que el receptor que reconoce los complejos antigeno-moléculas de histocompatibilidad en los linfocitos Tαβ posee dos sitios de unión para ligando en vez de uno por complejo TCR/CD3, revisando la estructura cuaternaria del receptor T.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 08.3/0018/98 (1998-1999).

— CICYT SAF96-0201-CO2 (1996-1999).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Mª Gemma Fernández-Miguel.** Multivalencia del complejo αβTCR/CD3. Universidad de Alcalá de Henares, 1998. Director: A. de la Hera.

— **Winston Socrates Andrade Lillo.** Anticuerpos Monoclonales CD3: caracterización de sus sitios de unión. Universidad de Alcalá de Henares, 1998. Directores: E. Sanz y A. de la Hera.

— **Laura Inés Salazar Fontana.** Caracterización de los niveles de expresión de la molécula CD28 en linfocitos humanos. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Directores: M. Álvarez Mon y A. de la Hera.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Dave, V., Cao, Z.-S., Browne, C., Alarcon, B., Fernández-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S, and Kappes, D.J. (1997). CD3δ-deficiency arrests development of the αβ but not the γδ T cell lineage. EMBO J. *6*, 1360-1370.

— Moyano, J.V., Carnemolla, B., Domínguez-Jiménez, C., García-Gila, M., Albar, J.P., Sánchez-Aparicio, P., Leprini, A., Querze, G., Zardi, L., and García-Pardo, A. (1997). Fibronectin type III5 repeat contains a novel cell adhesion sequence, KLDAPT, which binds activated α4β1 and α4β7 integrins. J. Biol. Chem. *272*, 24832-24836.

— Esteban, M.R., Giovinazzo, G., de la Hera, A., and Goday, C. (1998). PUMA1: A novel protein that associates with the centrosomes, spindle and centromere in the nematode *Parascaris*. J. Cell Science. *111*, 723-735.

— Fluckiger, A. C., Sanz, E., García-Lloret, M., Su, T., Hao, Q-L., Kato, R., Quan, S., de la Hera, A., Crooks, C., Witte, O., and Rawlings, D. (1998). *In vivo* reconstitution of human B cells ontogeny: from $CD34^+$ multipotent progenitors to Ig secreting. Blood *92*, 4509-4520.

— Gravestein, L.A., Amsen, D., Boes, M., Revilla Calvo, C., Kruisbeek, A.M., and Borst, J. (1998). The TNF receptor family member CD27 signals to Jun N-terminal kinase via Traf-2. Eur J Immunol *28*, 2208-2216.

Genética del Complemento
Complement Genetics

Santiago Rodríguez de Córdoba
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Begoña Granadino Goenechea
Pilar Sánchez-Corral
Investigadoras Contratadas / *Research Associates*

Brad Spiller (III-1998)
Diego Belavia (XII-1998)
Investigadores Visitantes / *Visiting Scientists*

Isabel Fernaud-Espinosa
Damian Heine Suñer
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

Olga Criado García
Daniel Beltrán Valero de Bernabé
Miguel Angel Díaz Guillén
Mª Esther Gallardo Pérez
David Pérez Caballero
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Mª Soledad Vara de Rey
Personal Técnico / *Technician*

I. Genética del Complemento. Estructura y función del sistema RCA

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 pertenecen a la misma familia de proteínas. Sus genes están estrechamente ligados en un agrupamiento genético localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q32) y que denominamos sistema RCA. Nuestro laboratorio mantiene desde 1983 una línea de investigación centrada en el estudio funcional y genético de proteínas

I. Complement genetics. Structure and function of the RCA gene family

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 1983, research in our laboratory has been focused on the study of the genetics and function of the proteins that regulate the complement system. Aspects of RCA biology being studied in our laboratory include: i) Genetic map-

reguladoras del sistema del complemento. Los aspectos de la biología del sistema RCA que se estudian actualmente en nuestro laboratorio 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; y iv) Interacción de proteínas reguladoras del complemento con patógenos microbianos.

II. 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 homogentisato a maleilacetoacetato. Recientemente, gracias a un modelo fúngico para alcaptonuria desarrollado por Dr. M. A Peñalva (CIB/CSIC) y aprovechando los enormes recursos generados por el Proyecto Genoma Humano, clonamos el gen HGO humano y demostramos que los pacientes AKU son homozigotos o heterozigotos compuestos para mutaciones pérdida de función en HGO. Hemos secuenciado el gen HGO en su totalidad e identificado un considerable número de mutaciones AKU en pacientes de diversos países. El análisis y caracterización de polimorfismos intragénicos nos ha proporcionado un extenso conocimiento de la variabilidad en el locus HGO en la población AKU y en la población normal. Todo ello ha sido muy útil en la identificación de los alelos AKU y en el estudio de sus migraciones en tiempos recientes de la historia humana.

III. Genes en la región 1q32 implicados en cáncer de mama

En el pasado nuestro laboratorio contribuyó de una manera muy significativa a establecer la organización genómica de

ping 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; and iv) Interaction of RCA proteins with microbial pathogens.

II. The 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. Recently, 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 have cloned the human HGO gene and demonstrated that AKU patients are homozygous, or compound heterozygous, for loss-of-function mutations in HGO. The HGO gene is now completely sequenced and a remarkable number of AKU mutations have been already identified in patients from many different countries. The analysis and characterization of intragenic polymorphisms has provided a general understanding of the variability at the HGO locus in both the AKU and the normal populations which has been very useful for the identification of AKU alleles and for tracing of their migration during recent human history.

III. The chromosomal region 1q32 and cancer

Our group has contributed significantly to the current understanding of the genomic organization of a fragment of the long arm of human chromosome 1, the region 1q32. From mid 1996, we have analyzed further this chromosomal location. We have significantly improved its genetic and physical maps, identified a recombination hot spot and defined a critical segment within 1q32 that presents allelic imbalance in approximately 60% of breast tumors and that overlaps the recombination hot spot. We

un fragmento del brazo largo del cromosoma humano, la región 1q32. Aprovechando este conocimiento, desde mediados de 1996, hemos profundizado en el estudio de esta región cromosómica, perfeccionando su mapa genético y físico, identificando dos hot spots de recombinación y definiendo una región crítica que solapa con uno de estos dos hot spots y muestra desequilibrio alélico en el 60% de los tumores de mama. Creemos que la región 1q32 contiene un (varios) gen (genes) importante (s) para la aparición y proliferación tumoral. Uno de los genes candidatos, denominado *ZF1*, esta siendo caracterizado funcionalmente en colaboración con el grupo del Dr. A. Silva (Centro de Investigaciones Biológicas).

IV. Genes causantes de epilepsias

La epilepsia progresiva mioclónica de Lafora o enfermedad de Lafora (EPM2; McKusick número 254780) es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por epilepsia, mioclonías, deterioro neurológico progresivo y cuerpos de inclusión intracelulares parecidos al glucógeno (cuerpos de Lafora). Un gen responsable de EPM2 se había identificado previamente en la región cromosómica 6q23-q25 utilizando análisis de ligamiento y mapeo por homozigosidad. En colaboración con el Dr. José Serratosa del Servicio de Neurología de la FJD hemos identificado y clonado el gen responsable de la epilepsia mioclónica de Lafora. La caracterización funcional de este gen permitirá conocer las bases moleculares de esta grave enfermedad, lo que sin duda será determinante a la hora de diseñar estrategias preventivas o terapéuticas.

V. Genes humanos de la familia SIX/*sine oculis* y su implicación en malformaciones congénitas

Este estudio pretende profundizar en el conocimiento de los genes humanos implicados en malformaciones congénitas aprovechando el enorme avance de la investigación en el área del desarrollo en otras especies. 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) hemos comenzado a desa-

believe that the 1q32 chromosomal region contains a gene(s) that is(are) important in tumorigenesis or tumor progression. One of the candidate genes, denoted ZF1, is now being structurally and functionally characterized in collaboration with the group of Dr. A. Silva (CIB/CSIC).

IV. Genes responsible for epilepsies

Progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type or Lafora disease (EPM2; McKusick number 254780) is an autosomal recessive disorder characterized by epilepsy, myoclonus, progressive neurological deterioration and glycogen-like intracellular inclusion bodies (Lafora bodies). A gene for EPM2 has been previously mapped to chromosome 6q23-q25 using linkage analysis and homozygosity mapping. In collaboration with Dr. José Serratosa from the Servicio de Neurología of the Fundación Jiménez Díaz we have recently identified and cloned the gene responsible for the Progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type. Future research will focused in the characterization of the spectrum of EPM2 mutations, the functional characterization of the product of the EPM2 gene and to develop strategies to prevent and cure this fatal form of epilepsy.

V. 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. Two of these genes (SIX3 and SIX9) have already been cloned and their structure and genomic sequence determined. These data should be useful in designing strategies to search for mutations in these genes in individuals with ocular malformations. In addition, we are performing functional analysis of the products of these genes in

rrollar un proyecto de investigación que pretende clonar y caracterizar genes humanos de la familia SIX/*sine oculis* y determinar su implicación en malformaciones oculares. En la actualidad hemos clonado dos de estos genes, SIX3 y SIX9, caracterizado su estructura y determinado su secuencia genómica. Todo ello nos ha permitido desarrollar métodos para la búsqueda de mutaciones en estos genes en individuos con malformaciones congénitas. Estos análisis se realizan en paralelo al estudio de la función de estos genes en modelos animales y cultivos celulares. En el futuro pretendemos ampliar estos estudios a otros genes humanos miembros de la misma familia SIX/*sine oculis*, que son importantes en el desarrollo de otros tejidos.

*animal models and in vitro systems. In the future we will extend these studies to other human genes that are also members of the SIX/*sine oculis *family and that might be important in malformations of other tissues.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 002 (1997).
— CAM, 08.6/0015/1997 (1998-2000).
— CEE, BMH4-CT96-1005 (1996-1999).
— CICYT, SAF-96/0055 (1996-1999).
— FIS, 95/0885, (1995-1997).
— FIS, 98/0687 (1998-2000).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Olga Criado García.** Significado biológico de las isoformas de C4b-binding protein (C4BP). Universidad Autónoma de Madrid 1997. Director: S. Rodríguez de Córdoba.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Benítez, J., Osorio, A., Rarroso, A., Arranz, E., Díaz-Guillén, M. A., Robledo, M., Rodríguez de Córdoba, S., and Heine-Suñer, D. (1997). A region of allelic imbalance in 1q31-32 in primary breast cancer coincides with a recombination hotspot. Cancer Res. 57, 4217-4230.
— Criado García, O., and Rodríguez de Córdoba, S. (1997). Sistema del complemento, sus receptores y proteínas reguladoras. Medicine 7, 2229-2235.

— Criado, O., González-Rubio, C., López-Trascasa, M., Pascual-Salcedo, D., Munuera, L., and Rodríguez de Córdoba, S. (1997). Modulation of C4b-binding protein isoforms during the acute phase response caused by orthopedic surgery. Haemostasis *27*, 25-34.

— Espinosa-Parrilla, Y., Morell, M., Souto, J.C., Borrell, M., Heine-Suñer, D., Tirado, I., Volpini, V., Estivill, X., and Sala, N. (1997). Absence of linkage between type III protein S deficiency and the PROS1 and C4BP genes in families carrying the protein S Heerlen allele. Blood *89*, 2799-806.

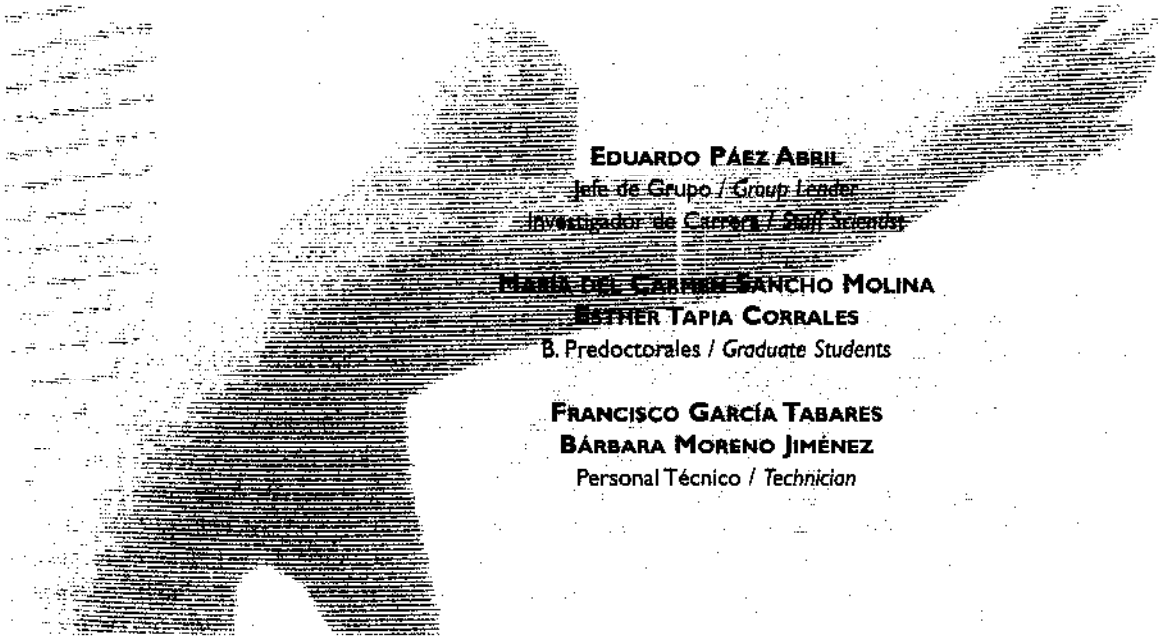
— Granadino B., Beltrán-Valero de Bernabé D., Fernández-Cañón J.M., Peñalva M.A., and Rodríguez de Córdoba, S. (1997). The human homogentisate 1,2 dioxigenase (HGO) gene. Genomics *43*,115-122.

— Heine-Suñer, D., Díaz Guillen, M. A., Pardo-Manuel de Villena, F., Benitez, J., Robledo, M., and Rodríguez de Córdoba, S. (1997). A high resolution map of the regulators of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32 that integrates new genes and markers. Immunogenetics *45*, 422-427.

— Beltrán-Valero de Bernabé, D., Granadino, B., Porfirio, B., Mayatepek, E., Aquaron, R., Moore, M.M., Festen, J.J.M., Sanmarti, R., Peñalva, M.A., and Rodríguez de Córdoba, S. (1998). Mutation and polymorphism analysis of the human homogentisate 1,2-dioxygenase gene in alkaptonuria patients. Am. J. Human. Genet. *62*, 776-784.

— Heine-Suñer, D., Díaz-Guillén, M.A., Lange, A. J., and Rodríguez de Córdoba, S. (1998). Sequence and structure of the human 6-phosphofructo-2-kinase-2,6bisphosphstase heart isoform gene (*PFKFB2*). Eur. J. Biochem. *254*, 103-110.

Virología Molecular de Vaccinia
Molecular Virology of Vaccinia



Eduardo Páez Abril
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

María del Carmen Sancho Molina
Esther Tapia Corrales
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Francisco García Tabares
Bárbara Moreno Jiménez
Personal Técnico / *Technician*

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 Ortopoxvirus 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

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

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.

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 eficacy 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.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CICYT, BIO94-0118 (1994-1997).

— DGICYT, PM97-0142 (1998-2001).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Francisco García Tabares.** Coevolución de virus y células en cultivos de células Vero persistentemente infectadas con el virus de la peste porcina africana. Universidad Autónoma de Madrid, 1998. Director: E. Páez Abril.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Luque, A., Cabañas, C., Raab, U. Letamendía, A., Páez, E., Herreros, L., Sánchez-Madrid, F., and Bernabéu, C. (1997). The use of recombinant vaccinia virus to generate monoclonal antibodies against the cell-surface glycoprotein endoglin. FEBS Lett. *413*, 265-268.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Raab, U., Langa, C., Letamendía, A., Lastres, P., Páez, E., and Bernabéu, C. (1997). Characterization of anti-CD105 monoclonal antibodies using recombinant vaccinia virus. In Leucocyte Typing VI. Kishimoto, T. eds. (Garland Publishing, Inc., New York.)

Departamento de Microbiología Molecular
Department of Molecular Microbiology

Jefe de Departamento *Department Head*	Rubens López García Ángel T. Martínez Ferrer (Hasta X-1997)
Profesores de Investigación	Roberto García López Rubens López García
Investigadores Científicos	Ramón Díaz Orejas José Luis García López Concepción García Mendoza José Antonio Leal Ojeda Ángel T. Martínez Ferrer Miguel Ángel Peñalva Soto Mª del Pilar Vilas Minondo
Científicos Titulares	Eduardo Díaz Fernández Mª Elena Fernández-Tresguerres Pedro García González Aldo González Becerra Mª 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 Eloísa Cano Congosto Manuel Carrasco Fernández Ángeles Guijarro Rodríguez Jesús López Ramírez Pilar Marcilla Cavanillas Francisca Pilar Morante González Bárbara Moreno Jiménez Consuelo Pardo Abarrio Teresa Rafoso Triano Elena Reoyo Hernández Carmelina Rodríguez Muñoz (Hasta V-1998) Mª Mercedes Sánchez Carmona Ana Mª Serrano López
Secretaria	Mª Victoria Lafita Togores

Biodegradación de la Lignina
Lignin Biodegradation

Ángel T. Martínez Ferrer
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Mª Jesús Martínez Hernández
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

José María Barrasa
Doctor Vinculado / *Associated Scientist*

Brigitte Böckle (Hasta VI-1998)
Francisco Guillén Carretero
Investigadores Contratados / *Research Associates*

Susana Camarero Fernández
Mª José Martínez Iñigo (Hasta X-1998)
Carmen Muñoz Martín (Hasta XII-1997)
Elisa Varela Sanz (Desde XII-1998)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Olga Calero Rueda (Desde XI-1998)
Lucilia Caramelo
Víctor Gómez Toribio (Desde X-1997)
Annette Heinfling (Hasta XII-1997)
Carolyn Palma Toloza (Hasta XII-1997)
Marta Pérez Boada
Javier Ruiz Dueñas
Elisa Varela Sanz (Hasta XII-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Ángeles Guijarro Rodríguez
Teresa Raposo Triano
Carmelina Rodríguez Muñoz (Hasta V-1998)
Personal Técnico / *Technicians*

I. Estudio y evaluación de los mecanismos enzimáticos y radicalarios en la degradación de la lignina por hongos de los géneros *Pleurotus* y *Phanerochaete*

Se plantean estudios sobre la biodegradación de la lignina utilizando como modelo los sistemas ligninolíticos de *Pleurotus eryngii* y *Phanerochaete flavido-alba*. El primero consta de las enzimas Mn-peroxidasa (MnP) y lacasa (más una aril-alcohol oxidasa productora de H_2O_2), mientras que el segundo incluye MnP, lacasa y lignina peroxidasa. A esta última se le ha atribuido un papel central en la degradación de la lignina, pero los estudios en *P. eryngii*, un hongo capaz de llevar a cabo una degradación selectiva de la lignina, sugieren que esto no siempre es así. La primera tarea será el estudio detallado de la MnP de *P. eryngii*: caracterización, clonación y secuenciación, propiedades catalíticas y regulación. Como punto de referencia se estudiará la MnP de *P. flavido-alba*. El hongo ligninolítico más estudiado, *Phanerochaete*

I. An evaluation of enzymatic and radical-mediated reactions in lignin attack by fungi from the genera Pleurotus *and* Phanerochaete

We propose to study different aspects of lignin biodegradation, using as models the ligninolytic systems of Pleurotus eryngii *and* Phanerochaete flavido-alba. *The first system includes the enzymes Mn-peroxidase (MnP) and laccase (together with H_2O_2-producing aryl-alcohol oxidase), while the second one includes MnP, laccase and lignin peroxidase. Although it has been often considered that the latter enzyme plays a central role in lignin degradation, studies with* P. eryngii *(a fungus producing selective degradation of lignin) suggest that a different system can operate in some fungi. The first task will be to carry out a complete study of the MnP from* P. eryngii*: characterization, cloning and sequencing, catalytic properties and regulation (compared with MnP from* P. flavido-alba*). The best known ligninolytic fungus,* Phanerochaete chrysosporium*, does not produce*

chrysosporium, no produce lacasa. La segunda tarea a desarrollar será caracterizar y determinar las propiedades catalíticas de la lacasa de *P. flavido-alba* así como, utilizando sondas para lacasa preparadas por PCR a partir de DNA de este hongo, utilizando secuencias deducidas del análisis del extremo N-terminal de la proteína completa y de péptidos derivados de ésta, determinar si *P. chrysosporium* posee el gen de esta enzima. Por otra parte, diferentes evidencias sugieren que las enzimas no llevan a cabo un ataque directo a la lignina dentro de la pared vegetal. Se considerará el papel mediador del Mn(III) producido por la MnP pero, para iniciar el ataque, parecen necesarios oxidantes mas enérgicos. El radical hidroxilo, cuya generación a partir del "*redox cycling*" de las quinonas constituye otra de las tareas planteadas, podría desempeñar esta función. Finalmente, las dos últimas tareas tienen por objeto establecer la importancia de enzimas y radicales en el proceso de degradación. Con este fin, se realizarán evaluaciones directas, mediante la adición de enzimas o compuestos químicos que favorezcan la generación de radicales, e indirectas, basadas en la modificación de los parámetros de cultivo, utilizando ^{14}C-lignina. También se llevarán a cabo estudios a nivel ultraestructural, en los que se analizará la alteración de la pared celular por sistemas generadores de radicales y enzimas, y se estudiará la penetración de éstas mediante técnicas de inmunolocalización.

II. Deslignificación biológica en la fabricación del papel: Optimización de mezclas de enzimas para el tratamiento de paja de cereales y otros materiales no leñosos

El objetivo de este estudio es optimizar tratamientos enzimáticos para la deslignificación de la paja de cereales - a través de una aproximación interdisciplinar que tendrá en cuenta las peculiaridades de las gramíneas tanto en lo relativo a la anatomía de los tejidos como a la estructura química de los polímeros de las pared celular - a fin de proporcionar una solución biotecnológica (incrementando la productividad por la mejora en el secado del papel, y la disminución de la lignina en los efluentes) a alguno de los principales inconvenientes del uso de la paja para la producción de pasta de papel, y reducir simultáneamente los costes de la energía y los pro-

laccase. The second task in the project will be to characterize and establish the catalytic properties of laccase from P. flavido-alba. *Using N-terminal sequences from the whole enzyme and from peptides obtained by enzymatic hydrolysis, a laccase probe will be prepared by PCR (using DNA from this species) and used to detect the presence of laccase genes in* P. chrysosporium. *Some pieces of evidence suggest that the ligninolytic enzymes are not responsible for the direct attack to the lignin polymer in plant cell-wall. The mediator role of chelated Mn(III) will be investigated, but stronger oxidants seem necessary to initiate the attack. This could be the role of hydroxyl radical, which will be investigated as a product of quinone redox cycling. Finally, the last tasks concern evaluation of the relevance of enzymatic and radical-mediated attacks to lignin. This will be done using ^{14}C-lignin and adding enzymes or compounds promoting radical generation (direct evidences), or modifying culture parameters (indirect evidences). Moreover, ultrastructural studies will permit to follow cell-wall penetration by enzymes (immunolocalization techniques) and to compare cell-wall alteration by enzymes and radical-generating systems.*

II. Biological delignification in paper manufacture: Optimization of enzyme mixtures for treating cereal straw and other non-woody materials

The objective is to optimize enzymatic treatments for straw delignification - through an interdisciplinary approach that will take into account gramineous peculiarities both in tissue anatomy and chemical structure of cell wall polymers - in order to provide a biotechnological solution (increasing productivity by improved dewatering, and decreasing lignin in effluents) to some of the main drawbacks of straw for pulp production, and to reduce simultaneously the costs of energy and chemicals used in pulp manufacture that will be combined with biological means. The interdisciplinary approach proposed in the Objective will include the following tasks: (1) Testing and improving strains of selected species of ligninolytic fungi for preferential degradation of straw lignin; (2-3) Identification and production of the fungal enzymes that could contribute to lignin removal, including those acting on phenolic and non-phenolic lignin moieties, and those splitting linkages with other straw polymers; (4) Enzymatic treatment of straw by the individual enzymes and by enzyme mixtures, which will exhibit synergistic effects (e.g., ligninolytic enzymes assisted by enzymes providing co-substrates or preventing repolymerization of degrada-

ductos químicos utilizados en la fabricación de la pasta de papel, que serán combinados con métodos biológicos.

III. Estudio de los extraíbles de la madera en la fabricación de pasta y papel: Implicaciones técnicas y ambientales y eliminación biológica

Los objetivos son: i) evaluar soluciones biotecnológicas para eliminar los compuestos responsables de los problemas de "*pitch*" de la madera (*Eucalyptus globulus* y *Pinus sylvestris*) y la pasta de papel; ii) determinar la influencia de la eliminación de estos compuestos sobre la calidad de la pasta y el papel y la toxicidad de las aguas residuales; y iii) identificar los constituyentes del "*pitch*" responsables del deterioro de la calidad del papel y de la toxicidad de los efluentes. El término "*pitch*" se aplica tanto a los extraibles de la madera como a los depósitos que estos extraibles causan durante los procesos de fabricación de pasta y papel. Los diferentes aspectos de la problemática del "*pitch*" son considerados en el presente proyecto, en el que participan dos compañías productoras de pasta de papel (ENCE-ES y PARENCO-NL). La identificación de los componentes responsables de los problemas de "pitch" constituye una de las primeras tareas del presente proyecto (desarrollada por el IRNAS-ES) con objeto de definir las estrategias mas adecuadas para un eficaz control del "*pitch*". Por otra parte, la toxicidad de los constituyentes del "*pitch*" está bien establecida. Tras la eliminación del cloro en el blanqueo de la pasta, los extraibles constituyen uno de los mas importantes problemas ambientales en las aguas residuales de las fabricas de pasta de papel (este aspecto ecotoxicológico es investigado por el CTP-FR). El uso de organismos y enzimas para tratar la madera o la pasta, respectivamente, ofrece la posibilidad de introducir procesos respetuosos con el entorno en la manufactura de pasta y papel. Sin embargo la mayor parte de estos procesos han sido desarrollados para maderas blandas, y deben ser adaptados para el caso de las maderas duras. Además, en los estudios anteriores no se llevaron a cabo amplios programas de "*screening*" de cepas. Un "*screening*" de este tipo, tal como se plantea en el presente proyecto, permitirá identificar los mejores biocatalizadores con objeto de llevar a cabo un eficiente control de los depósitos de

tion products); (5) Evaluation of the efficiency of the above enzymatic treatments in terms of the modifications of lignin composition and its relationships with other cell-wall polymers; (6) Monitoring histological changes produced by enzymes in order to verify the degradation of undesirable tissues (e.g., parenchymatic cells included in the fine fraction of pulp) and the preservation of fiber structure; (7) Testing pulping properties of the enzyme-treated straw, compared with fungus-treated straw and semichemical pulp, in combination with other pulping treatments and with special emphasis on the reductions in energy and chemicals and the decrease in the amount of lignin-derived products in effluents.

III. Wood extractives in pulp and paper manufacture: Technical and environmental implications and biological removal

The objectives are: i) to evaluate biotechnological solutions for eliminating problematic pitch compounds from wood (Eucalyptus globulus *and* Pinus sylvestris*) and pulp; ii) to determine the influence of eliminating these compounds in pulp and paper quality and wastewater toxicity; and iii) to identify the pitch constituents responsible for poor pulp and paper quality as well as effluent toxicity. The term pitch is applied to both wood extractives and to the deposits these extractives cause during pulping and papermaking processes. Previous studies were mostly concerned with the composition of softwood pitch. However, little is known about the composition of pitch from hardwoods and, specifically, from* Eucalyptus*, which is used extensively for paper pulp manufacture in Southern Europe. Wood extractives cause operation and quality problems in pulp and paper manufacture. Pitch problems are common in softwood pulping and papermaking. Nonetheless, they are also of economic relevance in the production of high quality hardwood pulps, particularly from* Eucalyptus*. Also papermaking processes using mixtures of virgin and recycled fibers present high pitch incidence due to interactions of extractives with paper additives. Both aspects of pitch problematic will be considered in the proposed project, which includes two pulp and paper companies (ENCE-ES, and PARENCO-NL). Moreover, the use of* Eucalyptus *wood by pulp and paper industry signify the need to identify the components responsible for pitch problems (a task that will be performed by the IRNA-ES) in order to define effective pitch control strategies. On the other hand, the toxicity of pitch constituents is well established. After the elimination of chlorine from pulp bleaching, the extractives now constitutes one of the most important environmental problem in wastewaters from pulp and paper mills (this ecoto-*

"*pitch*" en la pasta y de la toxicidad de los efluentes (estos estudios están siendo desarrollados por tres grupos de biotecnología, CIB-ES, WAU-NL, y WU-UK).

IV. 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-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 ii) 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 microscosmo).

xicological aspect will be investigated by the CTP-FR). The use of organisms and enzymes, to treat wood or pulp respectively, offers the possibility to introduce environmentally-friendly procedures in pulp and paper manufacture. However, most of the studies have been carried out with softwoods. These biotechnological processes still need to be adapted to hardwoods. Additionally, in previous works strains and enzymes were not selected from screening programs. Thus, a comprehensive screening is still required because it would most likely result in the identification of better biocatalysts with improved effectiveness towards selective extractive removal, to be used for eliminating pitch and effluent toxicity problems (these studies will be developed by three biotechnology groups, CIB-ES, WAU-NL, and UW-UK).

IV. Biodegradation of aromatic pollutants in soil by Pleurotus *species*

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 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*

— Agroindustria-UE, AIR2-CT93-1219 Coordinado por el CIB (1994-1997).
— Agroindustria-UE, FAIR-CT95-0560 CIB actúa como Coordinador Científico (1995-1999).
— CAM- Medioambiente CAM- 07M/0051, (1998-2000).
— CICYT-Biotecnología, CICYT-BIO96-0393 (1996-1999).
— CICYT-Biotecnología, CICYT-BIO96-2504-CE (1996-1999).
— CICYT-Biotecnología, CICYT BIO96-2500-E (Acción especial) (1997-1999).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Elisa Varela Sanz**. Detección de los genes que codifican lignina peroxidasa y aril-alcohol oxidasa (AAO) en hongos ligninolíticos. Caracterización molecular de la AAO de *Pleurotus* spp. Universidad Autónoma, 1998. Directora: M.J. Martínez.

Publicaciones/*Publications*

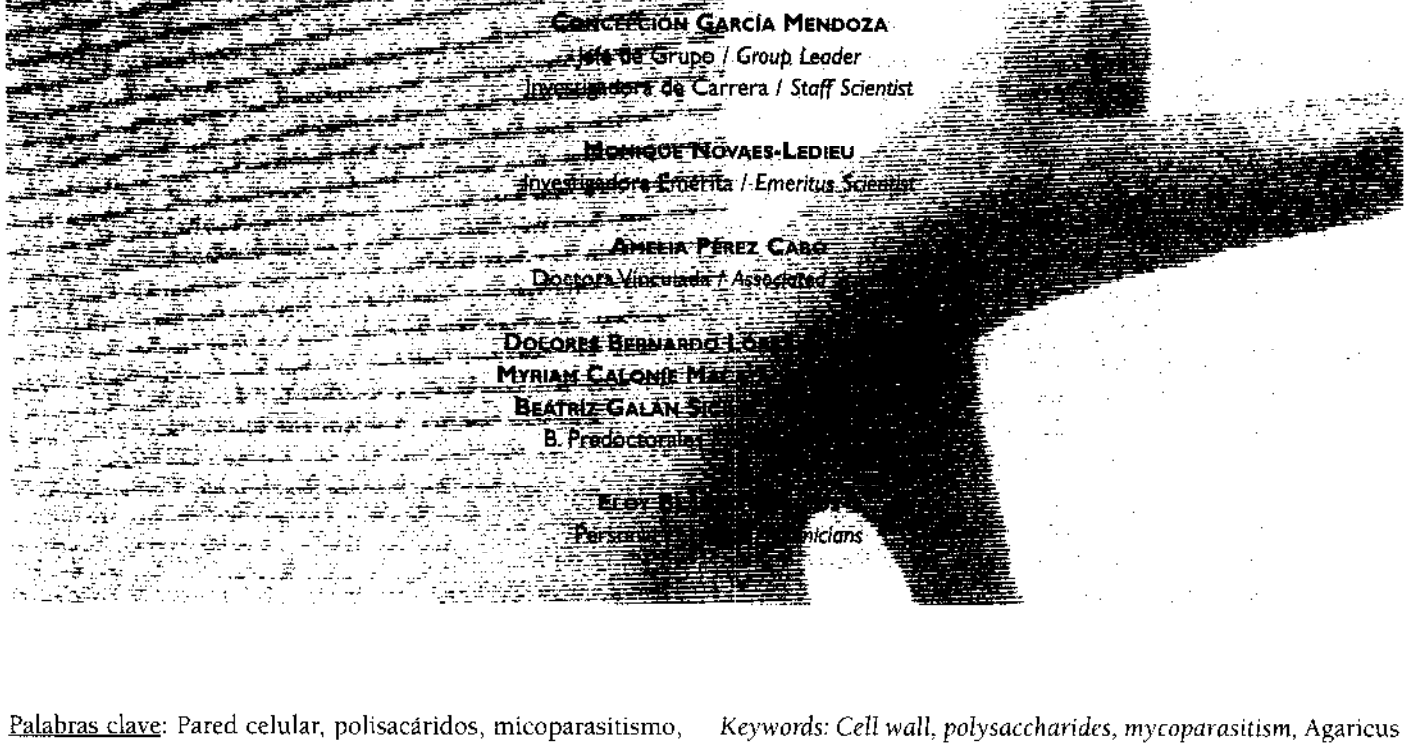
Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Bocchini, P., Galletti, G.C., Camarero, S., and Martínez, A.T. (1997). Absolute quantitation of lignin pyrolysis products using an internal standard. J. Chromatogr. A *773*, 227-232.
— Camarero, S., Galletti, G.C., and Martínez, A.T. (1997). Demonstration of *in situ* oxidative degradation of lignin side-chains by two white-rot fungi using analytical pyrolysis of methylated wheat straw. Rapid Commun. Mass Spectrom. *11*, 331-334.
— Galletti, G.C., Bocchini, P., Guadalix, M.E., Almendros, G., Camarero, S., and Martínez, A.T. (1997). Pyrolysis products as markers in the chemical characterization of paperboards from waste paper and wheat straw pulps. Bioresource Technol. *60*, 51-58.
— Guadalix, M.E., Almendros, G., Martínez, A.T., González-Vila, F.J., and Lankes, U. (1997). A ^{13}C CP/MAS NMR evaluation of the structural changes in wheat straw subjected to different chemical and biological pulping conditions. Biores. Technol. *60*, 245-249.
— Guillén, F., Martínez, M.J., Muñoz, C., and Martínez, A.T. (1997). Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. Arch. Biochem. Biophys. *339*, 190-199.
— Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Curr. Microbiol. 34, 1-5.
— Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii:* Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2166-2174.
— Sarkar, S., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (1997). Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. Biochim. Biophys. Acta 1339, 23-30.
— Barrasa, J.M., Gutiérrez, A., Escaso, V., Guillén, F., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1998). Electron and fluorescence microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. Appl. Environ. Microbiol. *64*, 325-332.
— Camarero, S., Barrasa, J.M., Pelayo, M., and Martínez, A.T. (1998). Evaluation of *Pleurotus* species for wheat-straw biopulping. J. Pulp Paper Sci. *24*, 197-203.
— Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Bergbauer, M., and Szewzyk, U. (1998). Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. FEMS Microbiol. Lett. *165*, 43-50.
— Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Bergbauer, M., and Szewzyk, U. (1998). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. Appl. Environ. Microbiol. *64*, 2788-2793.
— Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Bergbauer, M., Szewzyk, U., and Martínez, A.T. (1998). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. FEBS Lett. *428*, 141-146.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Camarero, S., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1997). Lignin-degrading enzymes produced by *Pleurotus* species during solid-state fermentation of wheat straw. En Advances in Solid State Fermentation, S. Roussos, B.K. Lonsane, M. Raimbault, and G. Viniegra-González, eds. (Dordrecht: Kluwer Acad. Publ.) pp. 335-345.

Bioquímica de Hongos
Biochemistry of Fungi



Palabras clave: Pared celular, polisacáridos, micoparasitismo, *Agaricus bisporus, Verticillium fungicola.*

El basidiomiceto superior *Agaricus bisporus* cultivado industrialmente para la alimentación humana constituye un excelente modelo para estudios de diferenciación y morfogénesis. La estructura química de sus paredes celulares ha mostrado diferencias significativas no solo a lo largo de su complejo ciclo biológico, sino también entre distintas variedades de la misma especie en igual estadío morfogenético.

Los cambios estructurales citados tienen lugar principalmente en los polisacáridos, componentes mayoritarios de las paredes celulares, pudiendo ser considerados primeramente como auténticos marcadores bioquímicos para la caracterización de cepas de interés comercial para su posterior protección legal, y en segundo término, como sustratos específicos de las enzimas polisacarídicas que intervienen en el micopa-

Keywords: Cell wall, polysaccharides, mycoparasitism, Agaricus bisporus, Verticillium fungicola.

The higher basidiomycete Agaricus bisporus *industrially cultivated for human nutrition constitutes an excellent model for differentiation and morphogenetic studies. Its cell wall chemical structure has shown significant differences not only through its complex biological cycle but also among distinct varieties of the same species in similar morphogenetic stages.*

The cited structural differences mainly take place in the polysaccharides, major cell wall components, which can be considered as the true biochemical markers to be used in the characterization of commercial interest strains for their further legal protection and also, as specific substrates of polysaccharide enzymes which are present in the mycoparasitism produced by Verticillium fungicola *in the industrial cultures of white button mushrooms.*

rasitismo producido por *Verticillium fungicola* en los cultivos industriales de champiñón.

I. Aislamiento y caracterización de nuevos polisacáridos de las paredes celulares de *A. bisporus*

Los polisacáridos que varían más significativamente en las distintas cepas de *A. bisporus* estudiadas corresponden a los glucanos del mucílago así como los glucanos y xilanos que cementan los componentes fibrilares de la pared, α(1-3) glucano y quitina. Por otra parte los polisacáridos cementantes son los que se reestructuran y reensamblan a lo largo de los distintos estadíos morfogenéticos del ciclo biológico de *A. bisporus* mostrando diferentes porcentajes de enlaces en sus dos configuraciones α y β, con un claro predominio de las uniones β(1-4) en el micelio vegetativo y las β(1-6) en el agregado.

II. Mecanismos celulares y moleculares del micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los cultivos industriales de *Agaricus bisporus*

La enfermedad verticiliosis o mole seca de los cultivos de champiñón está producida por el hongo *V. fungicola*, que parasita los carpóforos de *A. bisporus*, pero no el micelio vegetativo, por lo que se especula con una posible resistencia de las hifas del micelio vegetativo que no tendrían las hifas agregadas de los carpóforos. La diferente composición y estructura química de las paredes de las hifas de micelio vegetativo y agregado ha sido puesta de manifiesto previamente en este laboratorio. Igualmente hemos demostrado que el micopatógeno *V. fungicola* es capaz de sintetizar *in vitro* las enzimas necesarias para degradar las paredes celulares aisladas de ambos micelios vegetativo y agregado, mientras que *in vivo* solo puede digerir las paredes de las hifas de los carpóforos.

Estudios preliminares sobre el mecanismo de unión en la interacción hospedador-parásito han mostrado que un polisacárido de la pared celular de *V. fungicola* (glucogalactomanano) y un componente proteico (glicoproteína-lectina) de la superficie de la pared de *A. bisporus* parecen estar implicados.

I. Isolation and characterization of new polysaccharides of A. bisporus *cell walls*

The polysaccharides which vary more significantly in the distinct studied strains correspond not only to the mucilage glucans but also to the glucans and xylans which cement the wall fibrilar components, α(1-3) glucan and chitin. On the other hand those polysaccharides are restructrured and reorganized through the distinct morphogenetic stages of the A. bisporus *cell cycle showing different linkage percentages in their two configurations α and β, with a clear predominance of the β(1-4) linkages in vegetative mycelium and the β(1-6) in the aggregated.*

II. Cellular and molecular mechanisms of the V. fungicola *mycoparasitism on the* A. bisporus *industrial cultures*

The verticillium disease or dry bubble of the cultivated mushroom A. bisporus *is caused by the fungus* V. fungicola, *which parasites the* A. bisporus *fruit bodies, but does not parasite the corresponding vegetative mycelium. This fact has led to speculation of a possible resistance of the vegetative mycelium hyphae that is not present in the aggregated hyphae of fruit bodies. The different chemical composition and structure of the hyphal walls of vegetative and aggregated mycelia has been previously studied in this laboratory. We have also demonstrated that the mycopatogen* V. fungicola *is able to synthesize* in vitro *the necessary enzymes to degrade isolated cell walls of both vegetative and aggregated mycelia whereas* in vivo *it is only able to digest the hyphal walls of fruit bodies.*

Preliminary studies on the attachment mechanism in the host-parasite interaction have shown that a V. fungicola *wall polysaccharide (glucogalactomannan) and a proteic component (glycoprotein-lectin) of the* A. bisporus *wall surface seem to be implicated.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— Comunidad de Castilla-La Mancha 143/CH-40. (1997-2000).

— DGICYT PB 96-0811. (1997-2000).

— DGICYT, PB 95-0078-C02-02 (1996-1997).

Tesinas de Licenciatura/*Master Theses*

— **Beatriz Galán Sicilia.** Purificación y caracterización de una endo-1,3-1,6-β–glucanasa de *Agaricus bisporus*. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Directoras: C. García Mendoza y M. Novaes-Ledieu.

— **Mª Dolores Bernardo López.** Las lamelas de los carpóforos de *Agaricus bisporus:* Aproximación celular y subcelular. Universidad Complutense de Madrid, 1998. Directoras: C. García Mendoza y M. Novaes-Ledieu.

Tésis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Myriam Calonje Macaya.** Mecanismo de acción del micoparásito *Verticillium fungicola* en la infección al basidiomiceto *Agaricus bisporus*. Universidad Complutense de Madrid, 1998. Directoras: C. García Mendoza y M. Novaes-Ledieu.

Publicaciones/*Publications*

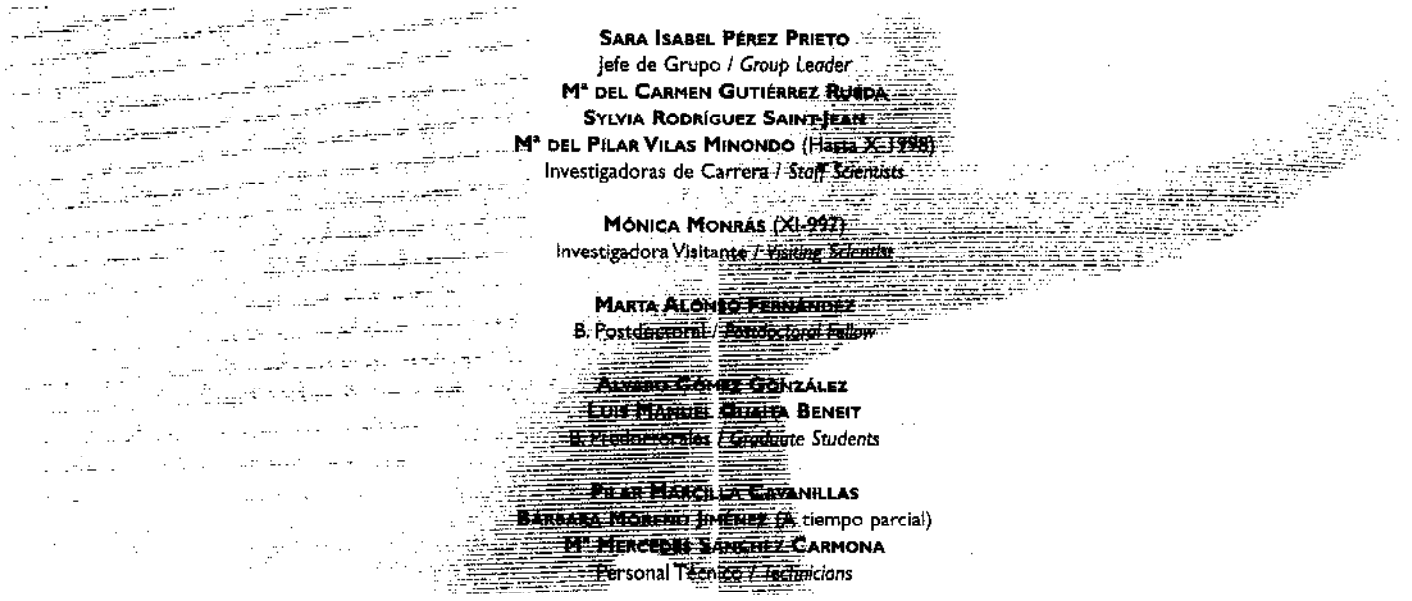
Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Calonje, M., García Mendoza, C., Galán, B. and Novaes-Ledieu, M. (1997). Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. Microbiology *143*, 2999-3006.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— García Mendoza, C., Calonje, M. and Novaes-Ledieu, M. (1998). Acción enzimática de *Verticillium fungicola* sobre las paredes celulares del cuerpo fructífero del champiñón cultivado *Agaricus bisporus* (Lange) Imb. En: II Jornadas Técnicas del champiñón y otros hongos comestibles en Castilla-La Mancha. Patronato de Promoción Económica (Ed. Diputación Provincial de Cuenca). pp 111-122.

Virología en Acuicultura
Virology in Fish-Aquaculture



Sara Isabel Pérez Prieto
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Mª del Carmen Gutiérrez Rueda
Sylvia Rodríguez Saint-Jean
Mª del Pilar Vilas Minondo (Hasta X-1998)
Investigadoras de Carrera / *Staff Scientists*

Mónica Monrás (XI-997)
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

Marta Alonso Fernández
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

Alvaro Gómez González
Luis Manuel Oliveira Beneit
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Pilar Marcilla Cavanillas
Bárbara Moreno Jiménez (A tiempo parcial)
Mª Mercedes Sánchez Carmona
Personal Técnico / *Technicians*

Durante los últimos años, el número de virus aislados en peces se ha incrementado como consecuencia del creciente interés que despiertan las enfermedades que estos microorganismos producen, especialmente en instalaciones de acuicultura.De todos los virus descritos solamente unos cuantos se consideran relevantes y de importancia económica, y pertenecen a familias conocidas de virus como *Birnaviridae, Rhabdoviridae, Iridoviridae*, y *Reoviridae*. Nuestro grupo se ha dedicado al estudio de las características biológicas, antigénicas y moleculares de las cepas españolas de virus que hemos aislado en diversas especies de peces cultivados. Durante el periodo 1997-98 hemos desarrollado dos líneas de investigación correspondientes a los distintos proyectos de I+ D citados a continuación:

I. Caracterización de algunos *Birnavirus, Rhabdovirus* y *Aeromonas* implicados en enfermedades de peces. Estudio de sus interacciones y virulencia.

Palabras clave: Virus de peces, IPNV, IHNV.

Nos hemos centrado en el estudio de las interacciones

The number of viruses isolated from fish has grown in the last years as a reflection of the increasing interest in fish diseases, particularly those occurring in aquaculture facilities. Of all the described viruses, only a few are considered to be of serious concern and economic importance and are from known virus families as Birnaviridae, Rhabdoviridae, Iridoviridae *and* Reoviridae. *We are currently working on the study of the biological, antigenical and molecular characteristics of the Spanish viral strains isolated in our laboratory from reared fish.*

Two research lines were carried out during the 1997-98 period, corresponding to the different R+D projects cited below:

I. Characterization of some Birnavirus, Rhabdovirus *and* Aeromonas *involved in fish diseases. Interactions and virulence studies.*

Keyword: Fish viruses, IPNV, IHNV.

We focused on the interactions between viruses in coinfec-

entre los dos virus de una coinfección, las variaciones genómicas de las cepas de virus y su correlación con diferentes virulencias.

Hemos determinado como el virus de la necrosis pancreática infecciosa, (IPNV),cepa Sp, interfiere con la multiplicación del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, (IHNV). Demostramos que el título infectivo del IHNV disminuyó significativamente, y que la consecución de pases sucesivos de la muestra coinfectada, lleva a una disminución del mRNA y a la ausencia del producto de PCR específico del IHNV. Consideramos la interferencia del IPNV-IHNV dependiente de la multiplicidad de infección y sucede a nivel de la síntesis de RNA, lo que se demostró mediante titulación del virus, citometría de flujo, *northern-blot*, y RT-PCR. Descartamos como explicación la autointerferencia por partículas defectivas, estudiando en paralelo los pases seriados de una infección simple del virus. Tampoco se detectó interferón en la línea celular utilizada. Hemos desarrollado un ensayo basado en un nested RT-PCR para la detección del IHNV en cultivos celulares coinfectados con el IPNV. En estos cultivos, IHNV fue detectado específicamente a una multiplicidad de infección mil veces menor que el IPNV. Este nested PCR puede por tanto ser mas apropiado para la detección virus IHN de bajo título infectivo en presencia del IPNV cuando existe interferencia. Estos hallazgos pueden ser importantes para comprender mejor las interacciones entre estos virus.

II. Desarrollo de métodos diagnósticos y estudio de virus líticos y persistentes que afectan a dorada (*Sparus auratus* L.)

Palabras clave: Virus de peces, métodos diagnósticos, *Birnavirus*, Linfocistis.

Una de las causas de mayor dispersión de los virus de peces es el tráfico de huevos embrionados contaminados y el de animales vivos portadores de virus.Por ello son necesarios nuevos métodos de diagnóstico que mejoren las medidas de control sanitario.

tions, the genomic variations of virus strains and correlation with different virulences.

We have examined whether infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strain Sp interferes with the growth of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). We have demostrated that the infective titer of the IHNV fraction decreased and that successive passages of the co-infected sample led to a decrease in IHNV mRNA and the absence of the specific PCR product for IHNV. The IPNV-IHNV interference was considered to be dependent of the multiplicity of infection and occurs at the level of RNA synthesis as studied by virus titration, flow cytometry, northern blot and RT-PCR. We ruled out autointerference by defective interfering particles by studying serial passage of a single virus. Interferon-like activity was not detected in the cell culture system used. We have developed a nested assay using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in cell cultures coinfected with Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). IHNV was specifically detected by nested PCR in coinfected cells at a multiplicity of infection that was 1000 times lower than that of IPNV. Nested PCR may thus be more appropriate for the detection of low infective titers of IHNV in the presence of IPNV when interference occurs. These findings may be relevant for understanding of the viral interactions.

II. Development of diagnostic methods and study of lytic and persistent viruses affecting gilt head seabream (Sparus aurata L.).

Keywords: Fish viruses, diagnostic methods, Birnavirus, *Lymphocystis.*

A major factor in the spread of fish viruses is the transfer of live carrier fish and contaminated eggs, and new diagnostic methods are needed for implementing fish health regulations and control. We have optimized of PCR parameters developed, (in a coordinated project with researchers from other institutions) and flow cytometry for the detection of viruses affecting seabream in comparison with other standard techniques traditionally used for salmonid virosis.

Nuestro grupo ha optimizado los parámetros de PCR y citometría de flujo para la detección de virus que afectan a doradas cultivadas, comparándolos con otros métodos standard tradicionalmente ensayados en el diagnóstico de las virosis que afectan a salmónidos. Realizamos infecciones experimentales en doradas y en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) menores de seis meses, para establecer la patogenicidad de un *Birnavirus* serologicamente relacionado con el IPNV, y que fue aislado originalmente de lenguados (*Solea senegalensis*), que manifestaban síntomas clínicos de enfermedad. El virus (solevirus), fue mas infectivo en doradas (mortalidad tan alta como un 76%) que en trucha arco iris (16% de mortalidad), pero animales de ambas especies fueron portadores del virus; pudimos detectar virus y antígenos virales en animales asintomáticos a los 33-44 días post infección, hecho no descrito previamente.

We have performed experimental infection assays in seabream (Sparus aurata) *and rainbow trout* (Oncorhynchus mykiss) *less than six months old, to establish the patogenicity of a* Birnavirus *serologically related to Infectious Pancreatic necrosis virus, that was originally isolated from soles* (Solea senegalensis) *having clinical symptoms of disease. The virus (Sole-virus) was more infective in seabream (mortality as high 76%) than it was in rainbow trout (16%) but both species were virus-carriers; it was possible to detect infective virus and viral antigens in asymptomathic fish after 33-44 days PI.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CICYT, AGF 95-0016 (1995-1998).

— CICYT, MAR 95 1949-C02-01 (1995-1998).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Marta Alonso Fernández.** Coinfecciones víricas producidas por *rhabdovirus-birnavirus* en salmónidos: Identificación, cinética y caracterización de virus implicados. Universidad Autónoma de Madrid. 1998. Directora: Sylvia Rodríguez Saint-Jean.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Pérez, S.I., and Rodríguez, S. (1997). Major viral diseases affecting fish aquaculture in Spain. Microbiol. SEM 13, (2) 149-160.

— Rodríguez, S., Vilas, M.P., Sarasquete, M.C., Rodríguez, R.B., Gutiérrez, M.C., and Pérez-Prieto, S. (1997). Isolation and preliminary characterization of a Birnavirus from sole *Solea senegalensis* in Southwest Spain. J. Aquatic Animal Health 9, 295-300.

— Sarasquete, C., González de Canales, M.L., Arellano, J., Pérez-Prieto, S., García Rosado, E., and Borrego, J.J. (1998). Histochemical study of lymphocystis disease in skin of giltthead seabream, *Sparus aurata* L. Histol. Histopathol. 13, 37-45.

— Barros M.L., and Gutiérrez, M.C. (1998). Antibiotic resistance of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walb.*) in Spain. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 18 (1) 1-8.

Artículos de Divulgación/Press Articles

— Pérez Prieto, S.I., y Rodríguez Saint-Jean, S. (1997). Control de enfermedades producidas por virus. Una tarea común. Culticumar *1*, 10-13.

Carbohidratos Microbianos
Microbial Carbohydrates

Juan Antonio Leal Ojeda
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Francisco Javier Medrano Martín
Investigador Contratado / *Research Associate*

Begoña Gómez-Miranda
Investigadora Visitante / *Visiting Scientist*

Oussama Ahrazem
Jezabel Domenech Manteca
María Teresa Pereyra de la Iglesia
B. Predoctorales / Graduate Students

Jesús López Ramírez
Personal Técnico / Technician

La fracción soluble en agua de los extractos alcalinos de la pared de los hongos, está formada generalmente por un único polisacárido cuya composición es similar en todas las especies de un género, si es homogéneo, y en las especies de un género teleomorfo y las del género anamorfo correspondiente. Estos polisacáridos se han propuesto como marcadores quimiotaxonómicos al nivel de género y para establecer las relaciones de los géneros teleomorfos con géneros anamorfos.

The water-soluble fraction (F1SS), from alkali extracts of the fungal cell wall, is generally formed by a single polysaccharide similar for all the species of homogeneous genera, and for the species of the teleomorph genus and its corresponding anamorph. These polysaccharides have been proposed as chemotaxonomic characters at the genus level and are useful to establish the correlation between anamorph and teleomorph genera.

Figura: Conidióforos y esporas de *P. vermoesenii* vistos al microscopio electrónico de barrido.

Figure: Scanning electron microphotography of conidiophores and spores of P. vermoesenii.

Nuevos marcadores quimotaxonómicos

Se han caracterizado los polisacáridos solubles en agua de la mayoría de las especies del género *Paecilomyces* y sus teleomorfos *Byssochlamys*, *Thermoascus* y *Talaromyces*. Los polisacáridos obtenidos pueden agruparse en tres estructuras:

I. Formada por un "core" de α-D-(1→6)-manopiranosa al que se unen en la posición 2 cadenas de β-D-(1→5)-galactofuranosa. La longitud de las cadenas y su número varía de unas especies a otras dando diferentes espectros de RMN que permiten diferenciarlas. Se integran en este grupo *P. variotii*, *P. lilacinus*, *P. viridis* y las especies de los géneros teleomorfos antes mencionados que tienen anamorfos en *Paecilomyces*.

II. Al "core" de manosa se unen, en la posición 4, residuos de β-D-galactopiranosa alternando con α-D-glucopiranosa. Esta estructura caracteriza a las especies *P. fumosoroseus* y *P. farinosus*.

III. Al "core" de manopiranosa se unen cadenas ramificadas de β-D-(1→5)-(1→6)-galactofuranosa. Esta estructura es característica de *P. marquandii*.

Estos resultados muestran que *Paecilomyces* es heterogéneo.

Los polisacáridos de especies del género *Fusarium* (anamorfo) y de *Gibberella* (teleomorfo) están formados por el "core" de manano al que se unen cadenas de β-D-(1→6)-galactofuranosa sustituidas en la posición 2 por un residuo de α-D-glucopiranosa, un dímero de ácido glucurónico y manopiranosa y un trímero compuesto de ácido glucurónico y dos residuos de manopiranosa. La proporción de estas cadenas varía de unas especies a otras.

Gliocladium vermoesenii = *Penicillium vermoesenii* (Fig.1), que produce enfermedades vasculares en diferentes tipos de palmeras, tiene un polisacárido similar al encontrado en *Fusarium*. De acuerdo con la composición de la pared, este hongo fitopatógeno debería clasificarse en el género *Fusarium*. Los polisacáridos solubles en agua de la pared permiten incluir los hongos de difícil clasificación en el género que les corresponde.

New chemotaxonomic markers.

Water-soluble polysaccharides have been characterised from most species of Paecilomyces *and its teleomorphs* Byssochlamys, Thermoascus *and* Talaromyces. *These polysaccharides may be grouped into three structures:*

I. To a core of α-D-(1→6)-mannopyranose are attached, at the 2 position, chains of β-D-(1→5)-galactofuranose. The length and number of these chains varies within species giving, therefore, NMR spectra which allow their differentiation. This group includes: P. variotii, P. lilacinus, P. viridis, *and the species of the teleomorph genera, above mentioned, whose anamorph belong to* Paecilomyces.

II. To the mannose core are linked, in the 4 position, residues of β-D-galactopyranose or α-D-glucopyranose. This structure is characteristic of P. fumosoroseus *and* P. farinosus.

III. To the mannose core are linked, in position 4, branched chains of β-D-(1→5)-(1→6)-galactofuranose. The structure is characteristic of P. marquandii.

These results show that the genus Paecilomyces is heterogeneous.

The polysaccharides FISS from species of Fusarium *(anamorph) and its teleomorph,* Gibberella, *are composed by a small mannan core linked to chains of β-D-(1→6)-galactofuranose substituted at the 2 position by three types of side chains: a residue of α-D-glucopyranose, a dimer of glucuronic acid and mannopyranose, or a trimer composed by glucuronic acid and two mannopyranose residues. The proportion of these chains varies in the different species.*

Gliocladium vermoesenii = Penicillium vermoesenii *(Fig.1), the causal agent of a disease of palm trees termed pink but rot, has a polysaccharide similar to the one found in species of Fusarium. According to the wall composition, this phytopathogenic fungus, should be classified in the genus* Fusarium. *The water-soluble polysaccharides of the fungal cell wall allow the inclusion of the fungi in natural groups.*

Pared celular, degradación y proteínas asociadas.

El objetivo de este trabajo es el de conocer mejor los procesos celulares implicados en la formación y degradación de la pared celular de los hongos y su interacción con otros organismos. Dentro de este apartado se están estudiando varias proteínas implicadas en la degradación de la pared celular: glucanasas, xilanasas y galactanasas. Además se están caracterizando una proteasa extracelular de *Metarhizium anisopliae* y una hidrofobina de *Verticillium fungicola*, ambas con un posible papel en la patogenicidad de estos organismos.

Cell wall, degradation and associated proteins.

The aim of this work is the study of cellular processes involved in the formation and degradation of the fungal cell wall, and its interaction with other organisms. We are studying several proteins involved in cell wall degradation: glucanases, xylanases and galactanases. We are also characterising an extracellular protease from Metarhizium anisopliae *and an hydrophobin from* Verticillium fungicola, *both with a possible role in the pathogenicity of these organisms.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— DGICYT, PB 95 0078 CO2 01 (1997-1999).

— PETRI, 95 0247 OP (1998-2000).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Jezabel Domenech Manteca.** Caracterización estructural e inmunológica de la pared celular de *Paecilomyces* spp. Universidad Autónoma de Madrid. 1997. Directores: J.A. Leal Ojeda y A. Prieto Orzanco.

— **Oussama Ahrazem.** Marcadores quimiotaxonómicos de *Fusarium* y géneros relacionados. Universidad Complutense de Madrid. 1998. Director: J.A. Leal Ojeda.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Ahrazem, O., Prieto, A., Leal, J.A., Gómez-Miranda, B., Domenech, J., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (1997). Structural elucidation of acidic fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of genera *Cylindrocladium and Calonectria*. Carbohydr. Res. *303*, 67-72.

— Leal, J.A., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., Domenech, J. Ahrazem, O., and Bernabé, M. (1997). Possible chemotypes from cell-wall polysaccharides, as an aid in the systematics of the genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Mycol. Res. *101*, 259-264.

— Madoz, J., Kuznetzov, B. A., Medrano, F.J., García, J. L., and Fernández, V. (1997). Functionalization of gold surfaces for specific and reversible attachment of a fused -Galactosidase and choline-receptor protein. J. Am. Chem. Soc. *119*, 1042-1051.

— Medrano, F.J., Alonso, J., García, J.L., Bode, W., and Gomis-Rüth, F.X. (1997). Crystallization and preliminary X-ray studies of the proline iminopeptidase from *Xantomonas campestris pv. citri*. FEBS Lett. *400*, 91-93.

— Prieto, A., Leal, J.A., Poveda, A., Jiménez-Barbero, J., Gómez-Miranda, B., Domenech, J., Ahrazem, O., and Bernabé M. (1997). Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. Carbohydr. Res. *304*, 281-291.

— Banbula, A., Potempa, J., Travis, J., Bode, W., and Medrano, F.J. (1998). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of gingipain R2 from *Porphyromonas gingivalis* in complex with H-D-Phe-Phe-Arg-chloromethylketone. Protein Sci. *7*, 1259-1261.

— Banbula, A., Potempa, J., Travis, J., Fernández-Catalán, C., Mann, K., Huber, R., Bode, W., and Medrano, F.J. (1998). Amino acid sequence and three-dimensional structure of the *Staphylococcus aureus* metalloproteinase at 1.72 Å Resol. Struc. *6*, 1185-1193.

— Bras, W., Diakun, G., Díaz, J. F., Maret, G., Kramer, H., Bordas, J., and Medrano, F.J. (1998). The susceptibility of pure tubulin to high magnetic fields. A magnetic birefringence and X-ray fibre diffraction study. Biophys J. *74*, 1509-1521.

— Budisa, N., Minks, C., Medrano, F.J., Lutz, J., Huber, R., and Moroder, L. (1998). Residue-specific bioincorporation of non-natural, biologically active amino acids into proteins as possible drug carriers. Structure and stability of the *per*-thiaproline mutant of annexin V. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. *95*, 455-459.

— García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., Medrano, F.J., and López, R. (1998). Versatility of choline-binding domain. Microbial Drug Res. *4*, 25-36.

— Medrano, F.J., Alonso, J., García, J.L., Romero, A., Bode, W., and Gomis-Rüth, F.X. (1998). Structure of proline iminopeptidase from *Xantomonas campestris pv. citri*. A prototype for the prolyl oligopeptidase family. EMBO J. *17*, 1-9.

— Poveda, A., Martín-Pastor, M., Bernabé, M., Leal, J.A., and Jiménez-Barbero, J. (1998). Solution conformation and dynamics of a fungal cell-wall polysaccharide isolated from *Microsporum gypseum*. Glycoconjugate J. *16*, 309-321.

Contribuciones a Libros/*Contributions to Books*

— Leal, J.A., and Bernabé, M. (1998). Taxonomic applications of polysaccharides. In Chemical Fungal Taxonomy, J. C. Frisvad, P. D. Bridge, and D. K. Arora, eds. (New York-Basel-Hong Kong). pp: 153-181.

Genética Bacteriana
Bacterial Genetics

Rubens López García
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Pedro García González
Ernesto García López
José Luis García López
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

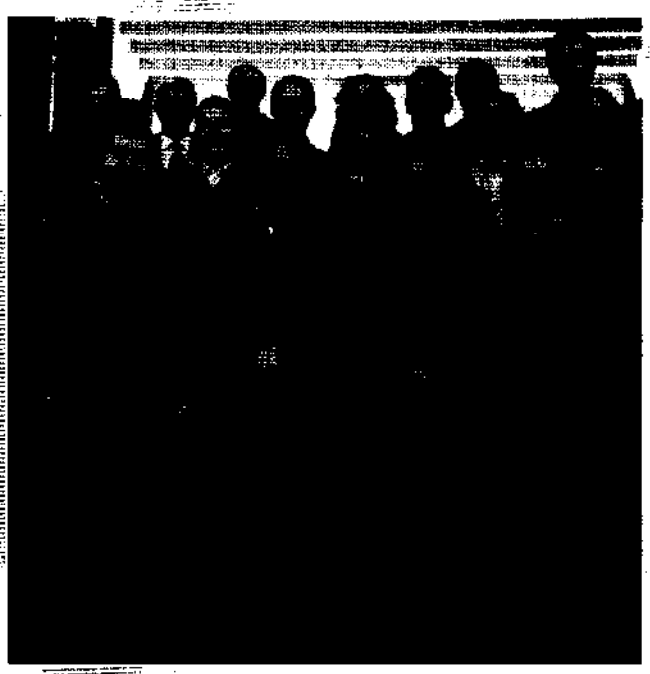
Eduardo Díaz Fernández
Rosario Muñoz Moreno (Hasta XI-1998)
Mª Auxiliadora Prieto Jiménez (Desde IX-1998)
Investigadores Contratados / *Research Associates*

Susanne Jaenecke (V-VI, 1997)
Marie Noël Bouet (VI-IX, 1998)
Investigadoras Visitantes / *Visiting Scientists*

Emmanuel Gindreau (Desde IX-1998)
B. Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*

Jorge Alonso Palacios (Hasta XII-1998)
Abel Ferrández Barca
Beatriz Galán Sicilia (Desde X-1997)
Mª Paz González Pérez (Desde I-1998)
Daniel Llull Peñalba
Virginia Obregón Sánchez (Desde X-1998)
Blanca de las Rivas González del Rey (Desde X-1998)
Begoña Torres Belinchón (Desde X-1997)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Eloísa Cano Contreras
Manuel Carrasco Fernández
Francisca Pilar Morante González
Personal Técnico / *Technicians*



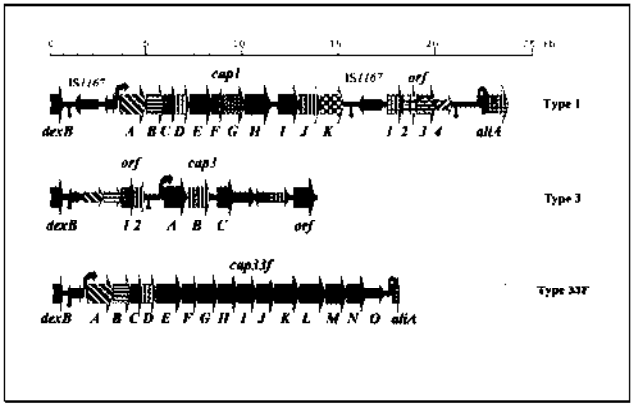


Figura: Organización genética de la región del DNA de Streptococcus pneumoniae que contiene los genes capsulares de tipo 1 (cap1), 3 (cap3) o 33F (cap33f). Las flechas pequeñas representan genes interrumpidos. Aquellos genes que comparten más de un 90% de nucleótidos idénticos han sido dibujados con colores y sombreados idénticos.

Figure: Genetic organization of the Streptococcus pneumoniae DNA region containing types 1 (cap1), 3 (cap3), or 33F (cap33f) capsular genes. Small arrows indicate interrupted open reading frames. Regions showing more than 90% identical nucleotides when comparing sequences of different serotypes, are represented by identical color and shading.

I. Estudios moleculares de factores de patogeneidad de *Streptococcus pneumoniae*: cápsulas, bacteriófagos y proteínas de unión a colina

Palabras clave: Neumococo, patogeneidad, cápsula, bacteriófagos, enzimas líticas.

Las principales aportaciones científicas de nuestro grupo durante los dos años que abarca la presente Memoria se resumen así: a) Se ha conseguido aislar un gen (*galU*) que codifica una enzima, identificada como la pirofosforilasa que participa en la formación de UDP-glucosa, un componente de todos los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* hasta ahora caracterizados. La inactivación de este gen conduce a la formación de cepas acapsuladas y, por lo tanto, de baja virulencia. Se postula que la proteína GalU es una interesante diana a la hora de desarrollar nuevas drogas para controlar la expansión de bacterias patógenas como neumococo. b) Se ha determinado la organización molecular de los genes responsables de la formación de los tipos capsulares 1 y 33F, así como la actividad bioquímica de las proteínas codificadas por algunos de estos genes. c) Hemos demostrado que el fago Cp-1 de neumococo codifica una proteasa que participa en la morfogénesis de dicho fago. Se trata del primer caso descrito en fagos que infectan bacterias Gram-positivas con estas características. Por otra parte, se llevó a cabo un análisis funcional de los genes que forman el sistema lítico de este fago. d) El aislamiento y caracterización de la enzima lítica del fago Dp-1 (Pal) de neumococo demostró que se trataba de una enzima quimérica natural, lo que proporcionaba un sólido argumento experimental a resultados anteriores de nuestro laboratorio sobre la organización modular de las enzimas líticas en bacterias Gram-positivas, así como sobre sus mecanismos de evolución por intercambio de módulos. e) Hemos podido identificar y caracterizar dos nuevas secuencias de inserción (IS*1381* e IS*1515*) en *S. pneumoniae* así como un nuevo gen que codifica una proteína conteniendo módulos de colina que podría participar en procesos de adhesión a la célula huésped.

S. pneumoniae es un importante patógeno humano con una renovada notoriedad clínica a causa de la aparición de

I. Molecular studies of genes of Streptococcus pneumoniae *and its bacteriophages involved in virulence*

Keywords: Pneumococcus, pathogenicity, capsule, bacteriophages, lytic enzymes.

The main achievements of our laboratory during the biennial period recorded by this Memoir is summarized as follows: a) identification and characterization of the gene galU *that codes for a uridine diphosphoglucose [UDP-Glc] pyrophosphorylase, a key compound in the biosynthesis of the capsular polysaccharide. Knockout* galU *mutants are unencapsulated pneumococci of low virulence. We postulate that GalU may be an appropriate target for the search of new drugs to control the pathogenicity of bacteria like pneumococcus. b) The capsular gene clusters of serotypes 1 and 33F have been characterized and the precise biochemical role of some of the genes that participate in the formation of the polysaccharide of type 1 has been established. c) We have demonstrated that the pneumococcal phage Cp-1 encodes its own protease that participates in phage morphogenesis. This represents the first example of a phage infecting Gram-positive bacteria exhibiting this property. On the other hand, we carried out a functional analysis of the two-gene lysis system of Cp-1. d) The Pal amidase encoded by phage Dp-1 turned out to be a chimeric lysin of intergeneric origin, a finding that confirmed evolutionary predictions on, and structural arrangements of, the lytic enzymes of many Gram-positive bacteria and its bacteriophages. e) We have identified two new insertion sequences (IS*1381 and IS1515*) in Streptococcus pneumoniae *as well as a new gene coding for a protein with a module for choline-recognition. We postulate for this protein a role in adhesion to the host cell.*

S. pneumoniae *(pneumococcus) is an important human pathogen of increasing clinical relevance because of the frequent isolation of antibiotic-resistant strains. One of the aims of our current project is to characterize the organization of the capsular genes of different pneumococcal clinical isolates. This approach will provide information on the mechanisms that regulate the expression of genes involved in capsular biosynt-*

estirpes multirresistentes. Uno de los objetivos del proyecto en curso pretende conseguir información básica sobre los mecanismos que controlan la formación de las cápsulas de neumococo, su principal factor de virulencia. Un segundo objetivo será profundizar en el estudio de las enzimas líticas del sistema de neumococo, proteínas sobre las que ahora poseemos una gran información en cuanto a su estructura y mecanismo de acción pero de las que carecemos de datos contrastados sobre su papel como factores de virulencia. Se pondrá especial énfasis en el análisis de las enzimas líticas de fagos que presentan peculiaridades bioquímicas no estudiadas hasta ahora. Asimismo, se llevará a cabo un análisis sistemático de la relación existente entre estirpes con relevancia clínica y presencia de fagos atemperados. Las alteraciones en la respuesta lítica que presentan muchas estirpes patógenas de neumococo que han sido tratadas con antibióticos β-lactámicos ha suscitado un renovado interés en el estudio del sistema lítico de neumococo y, por ello, se ampliarán los análisis físico-químicos ya realizados en nuestro laboratorio, a las nuevas enzimas líticas que tenemos en estudio. Además, se investigará el papel biológico de estas nuevas murein-hidrolasas de *S. pneumoniae*.

II. Eliminación biológica de contaminantes: Análisis y manipulación de rutas catabólicas bacterianas para la mineralización o transformación de compuestos aromáticos

Palabras clave: Biodegradación, biotransformación, compuestos aromáticos, contención.

Las principales aportaciones científicas durante los dos años que abarca la presente Memoria se resumen así: a) Se han aislado y secuenciado los genes responsables del catabolismo en *Escherichia coli* de distintos compuestos aromáticos como la feniletilamina y los ácidos 3-hidroxifenilpropiónico (3-HPP), fenilpropiónico (PP) y fenilacético (PA). Estas rutas, junto con la anteriormente caracterizada para el catabolismo del ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA), conforman un nuevo escenario en el metabolismo de esta bacteria modelo que hasta ahora había permanecido prácticamente desconocido. Se han identificado

hesis. On the other hand, we shall study the lytic enzymes of pneumococcus and its bacteriophages that are important virulence factors. Some of the phage-coded lytic enzymes will receive special attention. Moreover, the possible relationships between virulence and lysogeny will be studied. On the other hand, it has been reported that many virulent pneumococcal strains that are treated with β-lactam antibiotics change their usual bacteriolytic response to a bacteriostatic one, an observation that leads to a renewed interest on the role played by the lytic enzymes on the irreversible effects caused by these antibiotics. Consequently, the biological role of two new pneumococcal murein hydrolases will be studied in detail.

II. Bioremediation: Analysis and genetic manipulation of bacterial catabolic pathways for the mineralization and transformation of aromatic compounds

Keywords: Biodegradation, biotransformation, aromatic compounds, containment.

The main achievements in this field during the biennial period recorded by this book is summarized as follows: a) The genes responsible for the catabolism of different aromatic compounds in Escherichia coli, *e.g., phenylethylamine, 3-hydroxyphenylpropionate (3-HPP), propionate (PP) and phenylacetate (PA), have been isolated and sequenced. These pathways, together with the previously characterized catabolic pathway of 4-hydroxyphenylacetate (4-HPA), significantly contributed to open a scenario that had remained unknown until now on the catabolism of aromatics by this model bacterium. A huge number of genes involved in the catabolism, regulation, and transport of aromatic compounds have been identified and some of them have been further analyzed in more detail and used to extend the catabolic abilities of microorganisms of high environmental value such as* Pseudomonas *or* Rhizobium*; b) We have also characterized the PA catabolic pathway in* Pseudomonas putida *U, a work that has revealed important clues to understand the evolution of catabolic pathways; c) Concerning to our work in the field of bio-remediation of xenobiotic compounds, we have isolated and characterized the genes involved in the catabolism of styrene in* Pseudomonas *sp. Y2. The expression of this pathway is*

una gran variedad de genes catabólicos, reguladores, y transportadores de compuestos aromáticos, algunos de los cuales han sido analizados en mayor detalle y otros se han utilizado para ampliar la capacidad degradativa de organismos de interés medioambiental como *Pseudomonas* y *Rhizobium*; b) La ruta de degradación de PA en *Pseudomonas putida* U ha sido caracterizada molecularmente, lo que ha aportado datos muy interesantes sobre la evolución de estas rutas en distintos microorganismos; c) Referente a la biodegradación de compuestos xenobióticos, se han aislado y caracterizado los genes responsables del catabolismo del estireno en *Pseudomonas* sp. Y2. Cabe destacar que su expresión está controlada por un sistema regulador de dos componentes (histidina quinasa/activador), un mecanismo de regulación extremadamente infrecuente en las rutas catabólicas de compuestos aromáticos; d) Para tratar de reducir el problema que ocasiona la lluvia ácida se está estudiando la posibilidad de mejorar el proceso de biodesulfuración del petróleo diseñando *Pseudomonas* recombinantes (biocatalizadores), que portan los genes de desulfuración *dszABC* inicialmente aislados de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8; e) Además del proceso de biodesulfuración del petróleo, dentro del campo de la biotecnología aplicada al desarrollo de procesos de biotransformación, se han estudiado distintas enzimas de interés industrial como las β-lactam-acilasas y las D-aminoácido oxidasas de levaduras implicadas en la semisíntesis de antibióticos β-lactámicos y la β-galactosidasa de *Thermus* sp. T2. También, se ha desarrollado un proceso para producir 2-hidroxifenilacético utilizando mutantes PA^- de *E. coli*. Por último, utilizando el dominio de unión a colina de la enzima LytA de neumococo se ha desarrollado un nuevo concepto para el diseño de biosensores.

Los trabajos realizados sobre la degradación de compuestos aromáticos han proporcionado una gran cantidad de información sobre nuevas enzimas, transportadores y reguladores que serán objeto de estudio detallado durante los próximos años. El proceso de biodesulfuración de petróleo constituye un tema de gran relevancia industrial y por ello se intensificarán los estudios en este campo en colaboración con empresas del sector tratando de obtener biocatalizadores más eficaces y resistentes a las condiciones del biorreactor. En el

regulated by a two component regulatory system (histidine kinase/activator), an infrequent mechanism for the regulation of the catabolism of aromatic compounds; d) To reduce the problems caused by the acid rain, we are trying to increase the efficiency of the process used for the biodesulfurization of petroleum by constructing recombinant Pseudomonas *strains harboring the desulfurization genes initially isolated from* Rhodococcus erythropolis *IGTS8; e) We have also examined different biotransformation processes of industrial interest. In this sense, we have studied several enzymes involved in the semisynthesis of β-lactam antibiotics as well as some thermophylic enzymes of interest for the food industries. Moreover, we have developed a new method to produce 2-hydroxyphenylacetate using a* PA^- *mutant of* E. coli. *Finally, we have utilized the choline-binding domain of the pneumococcal autolysin to develop a new concept on biosensor design.*

The work carried out on the degradation of aromatic compounds has provided a huge amount of information about new enzymes, transporters, and transcriptional regulators that will be studied in detail during the next years. The biodesulfurization of petroleum is a process of high industrial interest that will be investigated in collaboration with some industries to develop more efficient and robust biocatalyzers. We will also focus our attention on the biosafety problems caused by the release of recombinant bacteria into the environment. In this field, we are developing containment systems based on complex regulatory networks that control lethal functions (colicin E3, EcoRI endonuclease) that are triggered by the presence/absence of contaminants (phenols). These systems are also useful genetic tools to carry out studies in Molecular Microbial Ecology.

campo de la Bioseguridad y en estrecha relación con la liberación de organismos recombinantes útiles en actividades de bio-remediación medioambiental, se están desarrollando sistemas de contención biológica y genética basados en complejos sistemas de regulación acoplados a la expresión de una función letal (colicina E3, endonucleasa *Eco*RI) que responden a la presencia/ausencia de compuestos contaminantes (fenoles). Estos sistemas de muerte celular programada artificialmente constituyen también una herramienta de gran utilidad para los estudios de Ecología Molecular Microbiana.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— BIOTECH-II, BIO-CT97-2313 (1997-2000)
— CAM, 06M/029/96 (1997-1998)
— CAM, 07B/0031/1997 (1998-1999)
— CICYT, AMB97-0603-C02-02 (1997-2000)
— DGICYDT, PB96-0809 (1997-2000)
— MEC. Proyectos de Investigación Conjunta con Iberoamérica (1997-1999)
— PETRO STAR INC. (1998)

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— **Abel Ferrández Barca**. Catabolismo de los ácidos fenilacético, fenilpropiónico y derivados en *Escherichia coli*. Universidad Complutense de Madrid, 1998. Director: E. Díaz.

Patentes/*Patents*

— García, J.L., Cortés, E., Alonso, J.L., Mellado, E., Díez, B., Guisán, J.M., Collado, A., Salto, F., and Barredo, J.L. (1997). Un procedimiento enzimático para preparar ácido 7-(4-carboxibutanamido) cefalosporánico utilizando la enzima D-aminoácido oxidasa de *Trigonopsis variabilis* modificada producida en *Escherichia coli*. Patente Española P9702008.

— Vián, A., Carrascosa, A., García, J.L., and Cortés, E. (1997). Un procedimiento para producir β-galactosidasa recombinante de *Thermus* sp (cepa T2) en células hospedantes, y purificarla en un sólo paso cromatográfico. Patente Española P9701759.

— Ferrández, A., Miñambres, B., García, B., Rodríguez, E., Luengo, J.M., García, J.L., and Díaz, E. (1998). Un procedimiento para la biotransformación del ácido fenilacético en ácido 2-hidroxifenilacático. Patente Española P9801503.

— Miñambres, B., Rodríguez, E., García, B., García, J.L., Ferrández, A., Díaz, E., and Luengo, J.M. (1998). Un procedimiento para la producción de ácido 2-hidroxifenilacético utilizando mutantes de la bacteria *Pseudomonas putida* U, así como una cepa recombinante de *E. coli* en la que se han introducido genes aislados de *Pseudomonas putida*. Patente Española P9802352.

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— De la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A., and Muñoz, R. (1997). Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity and quinolone-resistance. Microb. Drug Resist. *3*, 177-193.

— Ferrández, A., García, J.L., and Díaz E. (1997). Genetic characterization and expression in hetelogous host of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. *179*, 2573-2581.

— Ferrández, A., Prieto, M.A., García, J.L., and Díaz E. (1997). Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. FEBS Lett. *406*, 23-27.

— Gallardo, M.E., Ferrández, A., De Lorenzo, V., García, J.L., and Díaz, E. (1997). Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. J. Bacteriol. *179*, 7156-7160.

— García, E., and López R. (1997). *In vitro* activity of the antimalarial agent enpiroline against *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic bacteria. Rev. Esp. Quimioter. *19*, 226-230.

— García, E., and López, R. (1997). Molecular biology of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. *149*, 1-10.

— García, E., Arrecubieta, C., Muñoz, R., Mollerach, M., and López, R. (1997). A functional analysis of the *Streptococcus pneumoniae* genes involved in the synthesis of type 1 and type 3 capsular polysaccharides. Microb. Drug Resist. *3*, 73-87.

— García, P., Martín, A.C., and López, R. (1997). Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*: a molecular approach. Microb. Drug Resist. *3*, 165-176.

— López, R., García, E., García, P., and García, J.L. (1997). The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? Microb. Drug Resist. *3*, 199-211.

— Madoz, J., Kuznetzov, B.A., Medrano, F.J., García; J.L, and Fernández, V.M. (1997). Functionalization of gold surface for specific and oriented attachment of a fused protein made of β-galactosidase and a choline-receptor. J. Am. Chem. Soc. *119*, 1043-1051.

— Muñoz, R., Mollerach, M., López, R., and García, E. (1997). Molecular organisation of the genes required for the synthesis of type 1 capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*: formation of binary encapsulated pneumococci and identification of cryptic dTDP-rhamnose biosynthesis genes. Mol. Microbiol. *25*, 79-92.

— Prieto, M.A., and García, J.L. (1997). Identification of a novel regulator of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. *232*, 759-765.

— Prieto, M.A., and García, J.L. (1997). Identification of the 4-hydroxyphenylacetate transport gene of *Escherichia coli* W: construction of a highly sensitive cellular biosensor. FEBS Lett. *414*, 293-297.

— Roa, A., and García, J.L. (1997). Identification of the *pac* promoter. FEMS Microbiol. Lett. *151*, 9-16.

— Sánchez-Beato, A., García, E., López, R., and García, J.L. (1997). Identification and characterization of IS*1381*, a new insertion sequence in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. *179*, 2459-2463.

— Sánchez-Beato, A.R., and García, J.L. (1997). Molecular characterization of a family of choline-binding proteins of *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052. Evolution and gene redundancy in prokaryotic cell. Gene *180*, 13-21.

— Sheehan, M., García, J.L., López, R., and García, P. (1997). The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. Mol. Microbiol. *25*, 717-725.

— Alonso, J., Barredo, J.L., Díez, B., Mellado, E., Salto, F., García, J.L., and Cortés, E. (1998). Cloning, sequencing and heterologous expression of the gene encoding the D-amino acid oxidase of *Rhodotorula gracilis*. Microbiology *144*, 1095-1101.

— Díaz, E., Ferrández, A., and García, J.L. (1998). Characterization of the *hca* cluster encoding the dioxygenolytic pathway for initial catabolism of 3-phenylpropionic acid in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. *180*, 2915-2923.

— Espinosa, J.F., Montero, E., García, J.L., Dietrich, H., Schmidt, R.R., Martin-Lomas, M., Imberty, A., Cañada, J., and Jiménez-Barbero, J. (1998). *E. coli* β-galactosidase recognizes a high energy conformation of C-lactose, a non hydrolizable substrate analogue. NMR and modeling studies of molecular complex. J. Amer. Chem. Soc. *120*, 1309-1318.

— Ferrández, A., Miñambres, B., García, B., Olivera, E.R., Luengo, J.M., García, J.L., and Díaz, E. (1998). Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*: characterization of a new aerobic hybrid pathway. J. Biol. Chem. *273*, 25974-25986.

— García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., Medrano, F.J., and López, R. (1998). Versatility of choline-binding domain. Microb. Drug Resist. *4*, 25-36.

— Llull, D., López, R., García, E., and Muñoz, R. (1998). Molecular structure of the gene cluster responsible for the synthesis of the polysaccharide capsule of *Streptocccus pneumoniae* type 33F. Biochim. Biophys. Acta *1443*, 217-224.

— Mansur, M., García, J.L., Guisan, J.M., and García-Calvo, E. (1998). Cloning, expression and immobilization of glutamate racemase form *Lactobacillus fermenti* for the production of D-glutamate. Biotechnol. Lett. *20*, 57-61.

— Martín, A.C., López, R., and García, P. (1998). Functional analysis of the two-gene lysis system of the pneumococcal phage Cp-1 in homologous and heterologous host cells. J. Bacteriol. *180*, 210-217.

— Martín, A.C., López, R., and García, P. (1998). Pneumococcal phage Cp-1 encodes its own protease essential for phage maturation. J. Virol. *72*, 3491-3494.

— Medrano, F.J., Alonso, J., García, J.L., Romero, A., Bode, W., and Gomis-Rüth, F.X. (1998). Structure of proline iminopeptidase from *Xhantomonas campestris* pv. *citri*: a prototype for prolyl oligopeptidase family. EMBO J. *17*, 1-9.

— Mollerach, M., López, R., and García, E. (1998). Characterization of the *galU* gene of *Streptococcus pneumoniae* encoding a UDP-glucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis. J. Exp. Med. *188*, 2047-2056.

— Muñoz, R., García, E., and López, R. (1998). Evidence for horizontal transfer from *Streptococcus* to *Escherichia coli* of the *kfiD* gene encoding the K5-specific UDP-glucose dehydrogenase. J. Mol. Evol. *46*, 432-436.

— Muñoz, R., López, R., and García, E. (1998). Characterization of IS*1515*, a functional insertion sequence in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. *180*, 1381-1388.

— Olivera, E.R., Miñambres, B., García, B., Muñiz, C., Moreno, M.A., Ferrández, A., Díaz, E., García, J.L., and Luengo, J.M. (1998). Genetic organization, molecular characterization and biochemical analysis of the catabolic pathway involved in the assimilation of phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U: Description of the phenylacetyl-CoA catabolon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 6419-6424.

— Sánchez-Beato, A.R., López, R., and García, J.L. (1998). Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. *164*, 207-214.

— Velasco, A., Alonso, S., García, J.L., Perera, J., and Díaz, E. (1998). Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. Y2. J. Bacteriol. *180*, 1063-1071.

— Vián, A., Carrascosa, A.V., García, J.L., and Cortés, E. (1998). Structure of the β-galactosidase gene from *Thermus* sp T2: Expression in *Escherichia coli* and purification in a single step of an active fusion protein. Appl. Environ. Microbiol. *64*, 2187-2191.

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 (Hasta VIII-1997)
Investigador Contratado / *Research Associate*

Brian Nowak Thomson (Hasta IX-1998)
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

Josué Álvaro Blanco (Desde I-1998)
Eliecer Díez Hernández
María del Carmen Estébanez Osorio (Hasta III-1998)
José Manuel Mingot Ascençao
José Manuel Rodríguez Rodríguez (Desde VII-1998)
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Elena Reoyo Hernández
Personal Técnico / *Technician*

I. El factor transcripcional PacC: estructura y función

Los mohos son organismos que viven en ambientes sujetos a numerosas variaciones, una de las cuales es el pH. Para evitar derroches energéticos, los organismos disponen de un sistema que les permite sintetizar determinadas moléculas (como enzimas o metabolitos), unicamente cuando el rango de pH externo es adecuado para su función. Esta regulación por pH ambiental solo esta caracterizada en detalle, tanto a nivel genetico como molecular, en el eucariota simple *Aspergillus nidulans*. El estudio en profundidad de este sistema de regulacion ha sido llevado a cabo fundamentalmente por nuestro grupo y el del Prof. Herb Arst (Royal Postgraduate Medical School). La regulación por pH esta mediada por el factor de transcripción PacC (678 aminoácidos) que, en respuesta al pH alcalino, se procesa y elimina unos 400 aminoacidos de su extremo carboxilo, dando lugar a una forma procesada, activa. Esta forma procesada, de unos 260 residuos, es la responsable de la activa-

I. The transcription factor PacC: structure and function

Molds are organisms living in environments which undergo changes in physical variables, like pH. To avoid energy waste, organisms have control systems which allow them to synthesise specific products (like enzymes or metabolites) only when the external pH is adequate for their function. This pH regulatory mechanism has only been dissected, both at the genetic and molecular levels, in the lower eukaryote Aspergillus nidulans. *The thorough study of the system has been done by our group and Prof. Herb Arst's group (Royal Postgraduate Medical School).*

pH regulation in A. nidulans *is mediated by the PacC transcription factor (678 residues) which, in response to alkaline pH, is converted to a functional processed form by the proteolytic elimination of more than 400 residues at the C-terminal end of the protein. This processed, active form (~ 260 residues) is responsible of gene regulation: activates "alkaline" genes and represses*

ción de los genes "alcalinos" y la represión de los genes "ácidos". El factor de transcripción PacC se une al ADN por medio de tres dedos de Zn y hemos determinado el sitio óptimo de unión de PacC en un promotor "alcalino" y se ha llevado a cabo la modelización del complejo DNA-proteína (en colaboración con el grupo del Dr. A. Valencia, CNB). Haciendo uso de la gran colección de mutantes existentes en el sistema y de la facilidad de manejo, a nivel molecular y genético de *A. nidulans*, hemos delimitado el punto de proteólisis entre los residuos 252-254 y hemos establecido que los determinantes de la especificidad de corte deben residir entre los residuos 5-235. Asimismo, hemos demostrado el papel negativo de los 100 residuos más carboxi-terminales de la proteína PacC sobre su propia función, y la interacción intramolecular de dos dominios de la proteína.

Los genes responsables de la transducción de la señal de pH, genes *pal*, están siendo estudiados en colaboración con el grupo del Prof. Arst y hemos establecido una homología entre las cadenas de transducción de señal en *A. nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae* (donde hasta ahora no se ha definido la regulación por pH). También hemos demostrado que la proteína PacC es capaz de procesarse en la levadura (una vez que se ha obviado la señal de pH ambiental) y, aparentemente, al tamaño correcto, lo que indicaría que el mecanismo está conservado entre ambos ascomicetos. Actualmente estamos tratando de determinar cuál es la proteasa o el sistema responsable del procesamiento de PacC y estudiando la localización nuclear de este factor de transcripción.

Independientemente, en nuestro grupo, hemos clonado el gen que codifica la H^+-ATPasa de membrana plasmática de *A. nidulans*, que juega un importante papel en el mantenimiento del pH interno y que es un gen esencial para el hongo.

II. Base molecular de la alkaptonuria

Se ha desarrollado en nuestro laboratorio el uso del moho *Aspergillus nidulans* como organismo modelo para el estudio de metabolopatías congénitas humanas en el catabolismo de la fenilalanina. Mediante este modelo hemos clonado y caracteri-

"acidic" genes. PacC has a three Zn-finger DNA-binding domain and we have determined the optimal binding site in an "alkaline" promoter. In collaboration with Dr. A. Valencia's group (CNB), we have been able to do the modelling of the DNA-protein PacC complex. Taking advantage of the wide collection of pacC mutants we have and A. nidulans *simplicity of handling, we have delimited the processing site to residues ~252-254 and showed that specificity determinants reside at sequences located upstream of residue 235. We have also stablished the negative role of the C-terminal 100 residues on PacC function and showed the intramolecular interaction between two PacC domains.*

The pal genes, responsible of the pH signal transduction, are being studied together with Prof. Arst's group and we have showed an homology between signal transduction pathways in A. nidulans *and* Saccharomyces cerevisiae *(where no pH regulation has been described). We have also demonstrated that transgenic expression in yeast of a truncated PacC protein (pH signal independent) seemingly results in appropriate processing, indicating that the mechanism is conserved in both ascomycetes. We are currently trying to define the protease or proteolytic system responsible for PacC processing and studying the nuclear localisation of the protein.*

Independently, in our group, we have cloned the gene encoding the plasma membrane H^+*-ATPase of* A. nidulans, *which plays an important role in keeping the internal pH and is an essential gene.*

II. The molecular basis of alkaptonuria.

We have developed the use of the mold Aspergillus nidulans *as a model organism to study inherited diseases of human phenylalanine catabolism. Using this model, we have cloned and characterised, in collaboration with Dr. S. Rodríguez de Córdoba's group at the CIB, the human gene for alkaptonuria. Alkaptonuria (AKU; McKusick 203500), a monogenic recessive disorder, results from a deficiency in homogentisate dioxygenase, an enzyme of phenylalanine catabolism. We are currently studying with Dr. Rodríguez de Córdoba's group the AKU mutations in different populations and ethnic groups and establishing their inactivating*

zado, en colaboración con el grupo del Dr. S. Rodríguez de Córdoba en el CIB, el gen humano responsable de la alcaptonuria (AKU; McKusick 203500); una enfermedad monogénica recesiva en la que la deficiencia de una enzima del catabolismo de la tirosina (la homogentísico dioxigenasa), causado por mutaciones de pérdida de función en el correspondiente gen estructural, produce la acumulación de ácido homogentísico. En la actualidad, usando un sistema de expresión en bacterias, estamos estudiando junto con el grupo del Dr. Rodríguez de Córdoba las mutaciones presentes en AKU en diferentes poblaciones y grupos étnicos y estableciendo su efecto negativo sobre la actividad enzimática. También estamos realizando el análisis mutacional a saturación del gen HGO del hongo, utilizando una técnica de selección positiva de los mutantes, portadores de mutaciones que son posteriormente secuenciadas.

La alkaptonuria tiene, además de su interés clínico, un enorme interés histórico, al ser el primer error congénito del metabolismo descrito por Sir Archibald Garrod a principios de siglo y haber representado una evidencia importante para la hipótesis "un gen-un enzima" de Beadle y Tatum.

effects on the enzyme activity, using a bacterial expression system. We are also making a saturation mutagenesis analysis of the fungal HGO gene, using a positive selective technique for the isolation of mutants, carrying mutations which are being characterised by direct sequencing.

In addition to its clinical relevance, AKU has notable historical interest, as it was the first inborn error in metabolism described by sir Archibald Garrod at the beginning of the century and represented supportive evidence for Beadle and Tatum's "one gene-one enzyme" hypothesis.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— CAM, 08.6/0015/1997 (1997-2000).
— CICYT, Biotecnología, BIO94-0932 (1994-1997).
— CICYT, Biotecnología, BIO97-0348 (1997-2000).
— CICYT, SAF97-1789-E (1998-1999).
— ECDG XII EUROFUNG, BIO4CT96-0535 (1996-1999).

Publicaciones/*Publications*

Artículos en Revistas/*Journal Articles*

— Espeso, E.A., Tilburn, J., Sánchez-Pulido, L., Brown, C.V., Valencia, A., Arst, H.N. Jr., and Peñalva, M.A. (1997). Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. J Mol Biol. *274*, 466-480.

— Fernández-Cañón, J.M., and Peñalva, M. (1997). Spectrophotometric determination of homogentisate using *Aspergillus nidulans* homogentisate dioxygenase. Anal Biochem. *245*, 218-221.

— Granadino, B., Beltrán-Valero de Bernabé, D., Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A., and Rodríguez de Córdoba, S. (1997). The human homogentisate 1,2-dioxygenase (HGO) gene. Genomics *43*, 115-122.

— Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J.B., Brizuela, M.A., and González, A.E. (1997). Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Appl Environ Microbiol. *63*, 2637-2646.

— Beltrán-Valero de Bernabé, D., Granadino, B., Chiarelli, I., Porfirio, B., Mayatepek, E., Aquaron, R., Moore, M.M., Festen, J.J., Sanmarti, R., Peñalva, M.A., and Rodríguez de Córdoba, S. (1998). Mutation and polymorphism analysis of the human homogentisate 1,2-dioxygenase gene in alkaptonuria patients. Am. J. Hum. Genet. *62*, 776-784.

— Denison, S.H., Negrete-Urtasun, S., Mingot, J.M., Tilburn, J., Mayer, W.A., Goel, A., Espeso, E.A., Peñalva, M.A., and Arst H.N. Jr. (1998). Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. Mol. Microbiol *30*, 259-264.

— Fernández-Cañón, J.M., and Peñalva, M.A. (1998). Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue J. Biol. Chem. *273*, 329-337.

— Mansur, M., Suárez, T., and González, A.E. (1998). Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). Appl. Environ. Microbiol. *64*, 771-774.

— Peñalva, M.A., Rowlands, R.T., and Turner, G. (1998). The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. Trends Biotechnol. *16*, 483-489.

— Reoyo, E., Espeso, E.A., Peñalva, M.A., and Suárez, T. (1998). The essential *Aspergillus nidulans* gene *pmaA* encodes an homologue of fungal plasma membrane H(+)-ATPases. Fungal Genet. Biol. *23*, 288-299.

Iniciadores e Inhibidores de la Replicación del DNA en Microorganismos

DNA replication initiators and inhibitors in Micro-organisms

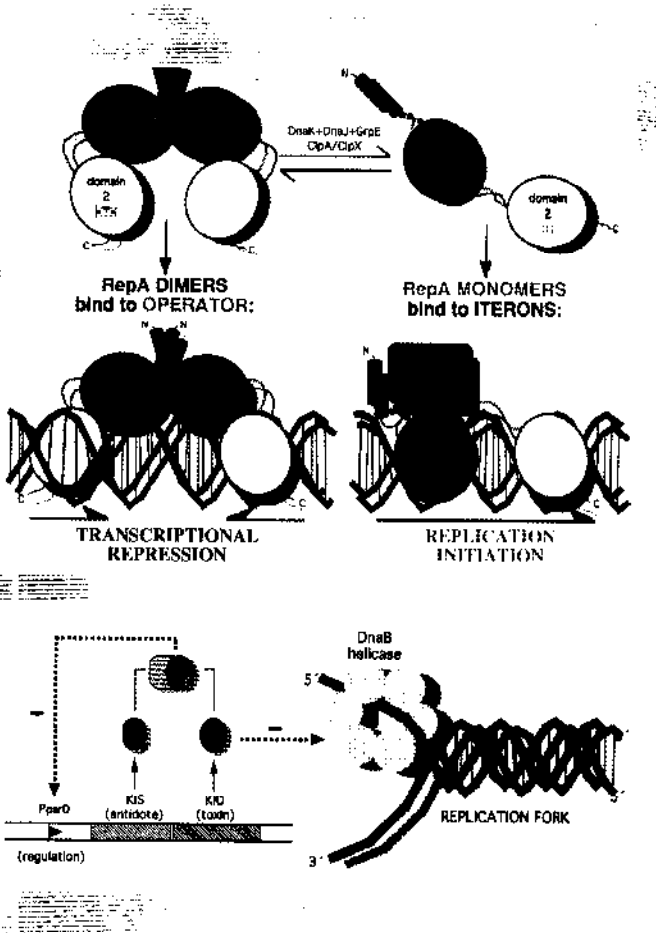
Ramón Díaz-Orejas
Jefe de Grupo / *Group Leader.*
Elena Fernández-Fresgüerres
Investigadores de Carrera / *Staff Scientists*

Rafael Giraldo Suárez
Investigador Contratado / *Research Associate*

Marc Lemonnier (Desde X-1998)
B. Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*

Guillermo de la Cueva Méndez
Teresa Díaz López (Desde X-1997)
Beatriz Maestro García-Donas
Sandra Santos Sierra
B. Predoctorales / *Graduate Students*

Consuelo Pardo Abarrio
Ana Mª. Serrano López
Personal Técnico / *Technicians*



Palabras clave: Replicación del DNA; Iniciador (RepA); Inhibidor de helicasas (Kid); Interacciones proteína-DNA; Interacciones proteína-proteína; Estructura y función de proteínas y DNA; Plásmidos.

La replicación del DNA es un proceso esencial para la transmisión del material genético en todos los organismos. En nuestro grupo, utilizando fundamentalmente como sistemas modelo las bacterias Gram-negativas *E. coli* y *Pseudomonas sp.*, estudiamos aspectos estructurales y funcionales de proteínas implicadas en la etapa inicial de la replicación del DNA, bien sea en calidad de ini-

Keywords: DNA replication; initiator (RepA); helicase inhibitor (Kid); protein-DNA interactions; protein-protein interactions; structure and function of proteins and DNA; plasmids.

DNA replication is an essential process for the transmission of genetic information in all organisms. In our group, using as main model systems E. coli and Pseudomonas *sp. Gram-negative bacteria, we study structural and functional aspects of proteins involved in the very early steps of DNA replication, either as initiators (RepA) or inhibitors (Kid). Our experimental approach to these topics is multiple (genetic, biochemical and biophysical).*

ciadoras (RepA) o inhibidoras (Kid). Metodológicamente, nuestra aproximación es pluridisciplinar (genética, bioquímica y biofísica).

Biología Molecular de iniciadores de la replicación del DNA (Figura 1)

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 (αhélice-giroβ-αhélice, 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 contrapuestas: iniciación (monómeros) y represión (dímeros).

Dos dominios globulares en RepA, C-terminales al motivo LZ, que adoptan conformaciones alternativas: compacta (en los dímeros) y extendida (en los monómeros). El primer dominio 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 motivo) en el reconocimiento de los iterones por la conformación extendida de RepA.

Mutaciones, afectando tanto al motivo LZ como al primer dominio globular de RepA, amplían el rango de huésped de pPS10 a Enterobacterias y apuntan a la existencia en RepA de una interfase de interacción con proteínas de la maquinaria replicativa celular.

Biología Molecular de Inhibidores de la Replicación del DNA (Figura 2)

Kid (12 kDa) es una proteína multifuncional del sistema de estabilidad de plásmidos en Enterobacterias ParD, aislado y caracterizado por nuestro grupo:

Molecular Biology of DNA replication initiators (Figure1)

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 transcriptional repression (dimers).

Two globular domains in RepA, C-terminal to the LZ motif, that adopt alternative conformations: compact (in the dimers) and extended (in the monomers). The first domain contains an additional DNA binding-motif which remains hidden in the compact conformation, but cooperates with the HTH motif (found in the second domain) in binding to the iterons by the RepA extended conformation.

Mutations affecting both the LZ motif and the first globular domain in RepA broaden the host-range of pPS10 to Enterobacteria. This points to the existence in RepA of an interphase for the interaction with proteins from the cellular replication machinery.

Molecular Biology of DNA replication inhibitors (Figure 2)

Kid (12 kDa) is a multifunctional protein from the Enterobacterial plasmid stability system ParD, isolated and characterized by our group:

Kid is able to inhibit efficiently DNA replication initiation, acting on the hexameric cellular replicative helicase, DnaB (52 kDa).

Kid es capaz de inhibir eficazmente la iniciación de la replicación actuando sobre la helicasa replicativa celular hexamérica (DnaB, 52 kDa).

La actividad tóxica inhibidora de Kid es neutralizada por su interacción con otra proteína, el antídoto Kis (10 kDa), con la que forma un complejo estable.

Los genes *kis* y *kid* forman un operón, autorregulado por el complejo Kid-Kis.

Mutaciones en dos sistemas cromosómicos de *E. coli* homólogos a ParD (ChpA y ChpB) son capaces de inhibir la actividad tóxica de Kid.

The toxic inhibitory activity of Kid is neutralised by interacting with other protein, the Kis antidote (10 kDa), forming an stable complex.

The kis *and* kid *genes constitute an operon that is self-regulated by the Kid-Kis protein complex.*

Mutations isolated in two E. coli chromosomal systems (ChpA and ChpB), homologues to ParD, are able to inhibit the toxic activity of ParD Kid.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*
— CICYT-PGC, PB94-0127 (1994-1998).
— CICYT-PGC, PB96-0917 (1996-2000).
— EU BIOTECH, PL970099 (1997-2000).
— EU BIOTECH, PL970106 (Coordinator: Ramón Díaz Orejas) (1997-2000).

Tesinas de Licenciatura/*Master Theses*
— **Marta Lages Gonzalo.** Estudio de RepA, una proteína bifuncional en la replicación del DNA, mediante ultracentrifugación analítica. Universidad Complutense de Madrid, 1998. Directores: R. Giraldo y G. Rivas.
— **Sandra Santos Sierra.** Análisis genético de interacciones veneno-antídoto en sistemas de muerte condicional bacteriana. Universidad Complutense de Madrid, 1997. Director: R. Díaz Orejas

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*
— **Juan Manuel Sánchez Romero.** Desarrollo de herramientas moleculares para el análisis genético y la generación de nuevos fenotipos en *Pseudomonas*. Universidad Autónoma de Madrid, 1997. Director: R. Díaz Orejas

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

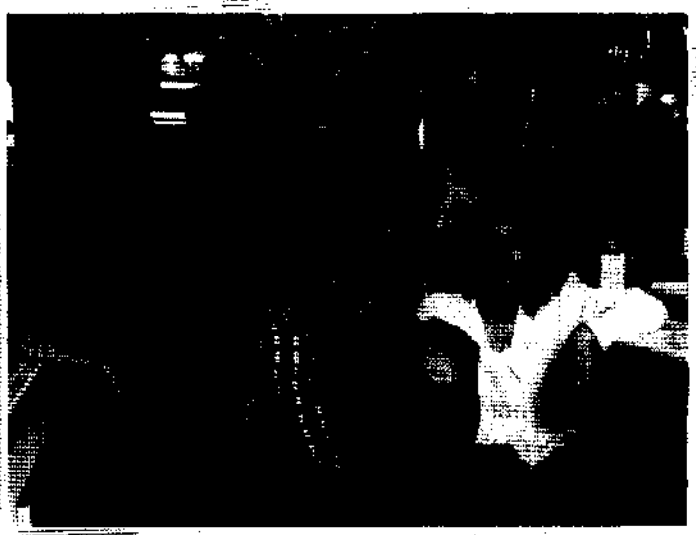
— Díaz-Orejas, R., Lurz, R., and Rückert, B. (1997). Enhancement of ColE1-type replication promoted by the Gp7 initiator protein of bacteriophage P4. FEMS Microbiol. Lett. *155*, 11-15.
— Santos-Sierra, S., Giraldo, R., and Díaz-Orejas, R. (1997). Functional interactions between homologous conditional killer systems of plasmid and chromosomal origin. FEMS Microbiol. Lett. *152*, 51-56.
— Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M.J., Espinosa, M., and Díaz-Orejas,R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *62*, 434-464.
— Giraldo,R., Andreu, J.M., and Díaz-Orejas, R. (1998). Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. EMBO J. *17*, 4511-4526.
— Sánchez-Romero, J.M., Díaz-Orejas, R., and de Lorenzo,V. (1998). Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulations of *Pseudomonas* strains. Appl. Environ. Microbiol. *64*, 4040-4046.
— Santos-Sierra, S., Giraldo, R., and Díaz-Orejas,R. (1998). Functional interactions between ChpB and ParD, two homologous conditional systems found in *Escherichia coli* Chromosome and in plasmid R1. FEMS Microbiol. Lett. *168*, 51-58.

Biología Molecular de Hongos Basidiomicetos
Molecular Biology of Basidiomycete Fungi

Aldo E. González Becerra
Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador de Carrera / *Staff Scientist*

Mariana Mansur Inglesias (VII-1998)
Gustavo Viniegra González (IV-1998)
Investigadores Visitantes / *Visiting Scientists*

Ainhoa Arana Cuenca
Milton Alvarado Sepúlveda
Tania González Díaz de Villegas
Catalina Hernández Fernández
Howard Junca Díaz
Alejandro Téllez Jurado
Susana Yagüe Plaza
Ernesto Zapico Fernández
B. Predoctorales / *Graduate Students*



Palabras clave: Basidiomicetos, genes, enzimas, biodegradación, expresión, regulación, transformación.

Keywords: Basidiomycetes, genes, enzymes, biodegradation, expression, regulation, transformation

Los basidiomicetos de podredumbre blanca tienen un complejo mecanismo que involucra enzimas que atacan directamente a la lignina, tales como la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa. También tienen enzimas que producen peróxido de hidrógeno para ayudar a la acción catalítica de las peroxidasas (por ejemplo: glucosa oxidasa y glioxal oxidasa), enzimas que pueden participar en la ruptura de los fenoles, aldehídos, otros derivados de la lignina (por ejemplo: quinona reductasa) o hidrocarburos aromáticos policíclicos, enzimas necesarias para prevenir la eventual acumulación excesiva de peróxido de hidrógeno y también, las enzimas pertenecientes a los ciclos Redox de las hidroquinonas (por ejemplo: catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa). Sin embargo, los estudios de las oxidasas y más importante aún de las lacasas y manganeso peroxi-

White rot basidiomycetes have a complex mechanism involving enzymes that attack lignin directly, such as, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), and laccase. Also they have enzymes supplying hidrogen peroxide to help the catalytic action of peroxidases, (i.e. glucose oxidase and glyoxal oxidase), enzymes that can participate in the breakdown of phenols, aldehydes, or the lignin derivates (i.e. quinone reductase) or polycyclic aromatic hydrocarbons, enzymes that are needed to prevent eventual excessive accumulation of hydrogen peroxide and also, the enzyme belonging to redox hydroquinone cycles (i.e. catalase, superoxidedismutase, glutathion peroxidase). However, the study of oxidase, and most important, the laccase and manganese peroxidase, seems to hold a greater interest because of their already proved ligninolytic activity in the purified form.

dasas, parecen poseer un mayor interés al haberse demostrado su actividad ligninolítica una vez purificadas.

El trabajo reciente de nuestro laboratorio se ha orientado al estudio de las enzimas oxidativas presentes en los sobrenadantes de los cultivos sumergidos de los hongos seleccionados en la etapa anterior. Los primeros resultados demostraron la presencia de una familia de isoenzimas de lacasas y manganeso peroxidasas presentes a diferentes tiempos en las cinéticas realizadas frente a sustratos conteniendo álcali-ligninas procedentes de efluentes industriales de la fabricación de pulpa de papel. Las enzimas fueron aisladas, purificadas y se determinó la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal. Con vista a construir oligonucleótidos y su posterior amplificación para obtener sondas. La segunda estrategia más simple y directa para el aislamiento de los genes que codifican para estas enzimas ha sido utilizar sondas heterólogas correspondientes a los genes previamente aislados y secuenciados de otros hongos ligninolíticos, como *Coriolus hirsutus, Phlebia radiata*, PM1, *Trametes versicolor* o *Trametes villosa*. Esta investigación de nuestro laboratorio nos ha conducido a la detección, aislamiento, clonaje y secuenciación de una familia de genes que codifican lacasa y lignina peroxidasa. El aislamiento y clonaje de 5 genes de lacasa y sus correspondientes ADNc de un posible número de 10 presentes en 4 cepas que degradan lignina y algunos de sus derivados. Se han construido genotecas parciales utilizando plásmidos o genotecas genómicas totales mediante fagos de las 4 cepas.

En los caldos de cultivo y utilizando análisis Northern y RT-PCR, se han puesto en marcha los estudios de regulación de la transcripción frente a los diferentes fuentes de C y N, pH e inductores, demostrando que esta familia de genes está regulada en forma diferencial y específica e influenciada por los parámetros estudiados.

En una segunda línea de trabajo las cepas y/o sus enzimas se han ensayado frente a efluentes de otro tipo de industrias (azucarera, papelera en base a bagazo de azúcar, cervecera, etc.) con interesantes resultados en la disminución de la DBO y del color. Se han caracterizado los sustratos transformados

Recent work of our laboratory has been focused to the study of oxidative enzymes from supernatants of submerged cultures of the before selected fungi. The first results demonstrated the existence of a laccase isoenzyme family and manganese peroxidase, detected at different times in the kinetics using substrate with alkalilignins from pulp and paper effluents. The enzymes were isolated, purified and identified the aminoacid N-terminal sequence, to construct primers subsequently amplified to obtain probes. The second most direct and simple strategy for isolating genes encoding these enzymes has been to use heterologous gene probes corresponding to the genes previously isolated and sequenced from other ligninolytic fungi, namely, genes from Coriolus hirsutus, Phlebia radiata, *PM1,* Trametes versicolor *or* Trametes villosa. *Gene library using lamda vectors are constructed and used. This research of our laboratory has led us to detection, isolation, cloning, and sequentiation of a family of genes encoding laccase and lignin peroxidase. They were isolated and cloned five genes, (with the cDNA) of a possible number of ten genes from four strains degrading lignine and some of its derivatives.*

The transcription regulation studies, using Northern and RT-PCR analysis, have demonstrated the different expression of this gene family under different parameters such as C and N sources, pH and activators.

In a second work line, the strains and/or their enzymes have been proved using effluents from another type of industry (sugarcane industry, pulp and paper production from sugarcane bagasse, and beer factory). In this way, they have been obtained interesting results like reduction of BOD and color. The fungi degradation of substrates in submerged cultures and SSF has been characterizated. These researches are developed in collaboration with laboratories from Cuba, Mexico and Italy.

In collaboration with Dr. Angel Domínguez from Salamanca University and Dr. Alan Dobson from UCC in Ireland, we did the heterologous laccase gene expression in yeast and ascomycetes strains. We obtain very interesting results about futures applications of recombinant laccase in the industry process use.

por los hongos en las cinéticas en cultivo sumergido y fermentación en estado sólido. Estos trabajos se llevan a cabo en colaboración con laboratorios de Cuba, México e Italia.

Se ha realizado en conjunto con los grupos de trabajo del Dr. Angel Domínguez, de la Universidad de Salamanca y con el Dr. Alan Dobson de la UCC, en Irlanda, las expresiones de genes de lacasa en cepas de levaduras e hifomicetos, respectivamente, obteniéndose hasta el momento interesantes resultados desde el punto de vista de futuras aplicaciones industriales de estas enzimas.

Las metas en el futuro inmediato, son determinar la contribución de cada gen a los mecanismos de degradación y cuáles son los factores que ponen en marcha la regulación de la transcripción. La caracterización a nivel funcional y molecular de estos genes tienen que contribuir a dilucidar estas preguntas.

En estrecha cooperación con el Dpto. de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá estamos investigando la producción de nuevas e interesantes enzimas oxidativas producidas por actinomicetos.

Se está colaborando con el grupo de la Dra. Nieves Valentín y la Dra Mª Pilar Luxan en el biodeterioro producido por microorganismos en obras de arte y monumentos.

Finalmente, nosotros hemos continuado las investigaciones con el grupo del Dr. R. Amils del CBM-CSIC, para aislar y caracterizar las enzimas producidas por los hongos que crecen en este ambiente extremo (pH ácido y alta concentración de metales).

Our immediate goals are to determine the contribution of each gene to the degradation mechanisms and to elucidate the reliable factors of expression regulation. The functional and molecular characterization of genes that we are realizing recently, must contribute to elucidate these questions.

We are searching about the production of new interesting oxidatives enzymes produced by Actinomycetes. This work is being doing with a very strong collaboration with the Microbiology and Parasitology Departament of the Alcalá University.

Our laboratory is collaborating with Dra. Nieves Valentín, from Ministery of Culture and Dra Mª Pilar Luxan from Eduardo Torroja Institute in the preservation of artistic heritage and monuments from microorganisms attack.

Lastly, we have continued the investigation, with the group of Dr. R. Amils from CBM-CSIC, to isolated and characterize enzymes produced by fungi which grow in this extreme environment (acid pH and high metal concentration).

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— Acción COST E-14 DG XII (1998-2001).
— CAM, 07M/0730/1997 (1997-1999).
— CE, Contract FAIR-CT95-0805-DG 12. (1995-1998).
— CE, Programa ALFA, Project FUNGATECH 2.037(6)-Project B1.
— CICYT, BIO95-2065-E (1996-1997).
— CICYT, BIO96-1131-CO2-01 (1996-1997).
— CICYT, BIO96-1716-CE (1996-1998).
— CICYT, BIO97-0655 (1997- 2000).
— Convenio CSIC-CNR (Italia) (1995-1997).
— Convenio Hispano-Cubano CSIC-CECE (1997-1998).
— DG XII RTD-96-8021 (1998-2001).

Publications/*Publications*

— Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J.B., Brizuela, M.A., and González, A.E. (1997). Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Appl. Env. Microbiol. *63*, 2637-2646.
— Calvo, A.M., Copa-Patiño, J.L., Alonso, O., and González, A,E, (1998). Studies of the producton and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. Arch. Microbiol. *171*, 31-36.
— Mansur, M., Suárez, T., and González, A.E. (1998). Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). Appl. Environ. Microbiol. *64*, 771-774.

Premios y Distinciones
Awards and Honours

— **José Antonio Abrisqueta Zarrabe**
Miembro del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital San Francisco de Asís. Madrid. 1997.
Miembro del Consejo de Redacción de la Revista de la Sociedad Internacional de Bioética (SIBI). 1998.
Miembro del Consejo Editorial de la Revista "Puericultura hoy", órgano de expresión de la Sociedad Española de Puericultura.

— **Nuria Almendro Motos**
Premio Extraordinario de Doctorado. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Curso: 1997-1998. Director: C. Bernabéu Quirante.

— **Angela Casado, Rosario De la Torre y Mª Encarnación López-Fernández**
Premio Hoeschst Marion Roussel. Mejor comunicación: Diabetes tipo II en el Anciano. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Geriatría y Gerontología.

— **Pedro Castañera Domínguez**
Moderador de la mesa redonda sobre "Control integrado de plagas y enfermedades" dentro del Curso Superior de Mejora Genética Vegetal, CIHEAM/IAMZ. Zaragoza.
Miembro del Comité Científico de la Asociación para la Gestión Integrada de Cultivos (AGROFUTURO).
Redactor asociado de la revista Investigación agraria del INIA.
Miembro del *Steering Committee* del grupo IPM-Europe financiado por la UE.

— **Jesús del Mazo**
"Reproductive Toxicology. In vitro Germ Cell Developmental Toxicology, from Science to Social and Industrial Demand". Edited by J. Del Mazo. Plenum Press. New York, London. *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. *444*, 223 páginas, 1998. (ISBN 0-306-46025-4).

— **José Ramón Díaz-Ruiz**
Miembro del Consejo Editorial de la Revista *"Virología"*, publicación oficial de la S.E.V.
Miembro del Consejo de Redacción de la Revista *"Phytoma-España"*.
Miembro del Consejo de Redacción de la Revista *"Investigación Agraria. Serie Producción y Protección Vegetales"*, publicación del INIA.

— **Manuel Espinosa**
Chairman de la Red "*Molecular Biology and Ecology of Plasmid-mediated Gene Spread*". *European Science Foundation*. 1994-1997.
Miembro del Consejo Técnico del Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus (Instituto de Salud Carlos III). 1995-1998.
Premio de Biología "Cultura Viva" para 1997.
Miembro invitado del Tribunal de Tesis de Rasmus B. Jensen. Universidad de Odense (Dinamarca), 1997.
Miembro del *International Advisory Board of the Meeting Plasmid Biology* 1998. (Mérida, Méjico).
Evaluador invitado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina).
Evaluador invitado por la Academia de Ciencias de la República Checa.
Miembro del Editorial Board de la Revista *Plasmid*. 1998-2001
Miembro del Comité de Honor del 25 Aniversario de la Muerte de Salvador Allende.
Miembro del Comité Coordinador de la Acción Concertada EU-BIOTECH-MECBAD

— **Rubens López García**
Miembro del Consejo Editorial de *FEMS Microbiology Letters*.

— **Francisco Javier Medina Díaz**
Miembro de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Biología Celular.

— **Susana Moreno Díaz de la Espina**
Vocal electa Comité Científico Asesor del CSIC por el Ámbito de Biología y Biomedicina, (1997-2001).
Vocal de la Comisión del Área de Biología y Biomedicina del CSIC (1997-2001).

— **Félix Ortego Alonso**
Nombrado por el MMA representante Español en "*Expert group on monitoring to Bt-toxins*" organizado por la UE, DG XI.

— **Eduardo Páez Abril**
Miembro del Consejo Editorial de la revista Virología.

— **Eduardo Rial Zueco**
Miembro del Consejo Editorial de *Molecular Membrane Biology*.

— **María del Carmen Risueño Almeida**
Miembro del Comité Científico del CNRS/INSERM, (1998-1999).

— **José Mª Rojo, Gabriel Criado Carrasco, Mª José Feito Castellano**
Premio SANDOZ 1997 a trabajos de investigación de Inmunología.

— **Gloria del Solar Dongil**
Ponente invitada a la Reunión Internacional "Diversificación 98" por el Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar.

Organización de Congresos y Cursos
Organization of Congresses and Courses

— **Patricio Aller y José Mª Almendral**
Coordinación de Curso de Doctorado en el Centro de Investigaciones Biológicas, "Proliferación y Diferenciación Celular: Funciones Celulares Básicas". Madrid, Febrero-Marzo, 1997.

— **Pedro J. Aparicio Alonso**
Miembro del Comité Científico Asesor de la organización de los siguientes congresos:
XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal – V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal, celebrado en Córdoba, 23-26 de septiembre de 1997.
5th *International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation* (3rd *Fohs Biostress Symposium),* celebrado en Luso (Portugal), 13-17 de julio de 1998.
11th *Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology,* celebrado en Varna (Bulgaria), 7-11 de septiembre de 1998.

— **Mª Enriqueta Arias y Aldo González**
Curso en la Universidad de Alcalá. "Biodegradación de la lignocelulosa: Aplicaciones Tecnológicas". Alcalá de Henares, Junio, 1997.

— **Carmelo Bernabéu Quirante**
Coorganizador. Workshop "TGF- signalling in development and cell cycle control" Fundación Juan March de Estudios e Investigaciones. Madrid, Febrero 1997.

— **Angela Casado Moragón**
Curso de Titulación Propia: "Técnicas Inmunohematológicas y electroforéticas aplicables al tejido sanguíneo humano". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense. Madrid. Septiembre, 1997.
Curso de Titulación Propia "Técnicas Inmunohematológicas y electroforéticas aplicables al tejido sanguíneo humano". Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid. Junio-Julio 1998.

— **Enrique J. de la Rosa Cano**
Comité organizador del *Workshop* "Avances en Biología Molecular y Celular". Centro Nacional de Biotecnología. Diciembre, 1997.

— **Jesús del Mazo Martínez**
Chairman: Workshop on Reproductive Toxicology "In vitro *Germ Cell Developmental Toxicology from Science to Social and Industrial Demand*" . Comisión Europea./ Biotecnología. Granada, España. Octubre, 1997.

— **Ramón Díaz Orejas**
Reunión sobre "Initiation of Replication in Prokaryotic Extrachromosomal elements". Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. Madrid, 1998.
Workshop on "Initiation of Replication in Prokaryotic Extrachromosomal elements". Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. Madrid, 1998.

— **José Ramón Díaz-Ruíz**
Miembro del Comité Científico del V Congreso Nacional de Virología. Santiago de Compostela. 1997.
Organizador y Presidente de la Sesión Virus de Plantas en el V Congreso Nacional de Virología. Santiago de Compostela. 1997.

— **Manuel Espinosa Padrón**
Co-organizador del *III European Science Foundation meeting on Plasmid molecular biology and ecology.* Cuenca. Septiembre, 1997.
Co-organizador del *Workshop* de la Fundación Juan March "*Macromolecular Interactions at initiation of replication in prokaryotic extrachromosomal elements*" Madrid. Febrero, 1998.
Co-organizador y profesor del Curso de Doctorado sobre "Replicación del DNA procariótico". Universidad de Cantabria. Santander. Mayo, 1998.

— **Gonzalo Giménez-Martín**
Miembro del Comité Asesor Internacional. VII Congreso Iberoamericano de Biología Celular. Montevideo, 26-30 de Octubre de 1998.

— **Santiago Lamas Peláez**
IV Simposio Internacional del Instituto "Reina Sofía" de Investigaciones Nefrológicas. Madrid, Noviembre de 1997.
Workshop: "*Nitric oxide: from discovery to the clinic*" Fundación Juan March. Madrid, Junio,1998.

— **Vicente Larraga Rodríguez de Vera**
Co-orgabizador: Mecanismos Moleculares de Patogenicidad Microbiana Universidad Complutense, Madrid. Junio, 1998.
Coordinador: I Reunión del Grupo de Parasitología Molecular de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Sevilla, Septiembre, 1998.

— **Dionisio López Abella**
Cursos Plan de Formación Interministerial 1998. "Organismos de cuarentena en plantas vivas ornamentales y flores cortadas" y "Organismos de cuarentena en plantas vivas de frutales de pepita". Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. UPM.
Curso "Transmisión de virus de plantas por artrópodos vectores". Universidad Complutense de Madrid. Curso académico 1997-1998 y 1998-1999.

— **Rubens López García.**
Miembro del Comité Organizador del "European Congress of Chemotherapy-3" que se celebrará en Madrid, 7-10 Mayo, 2000.

— **Ángel T. Martínez y Mª Jesús Martínez**
Curso de Doctorado: "Biodegradación de la lignocelulosa: Aplicaciones Tecnológicas". Facultad de Ciencias de la Universidad de Alcalá de Henares. Curso organizado en colaboración con las Dras Enriqueta Arias y Mª Isabel Pérez-Leblic, 1977.
Curso de Doctorado: "Hongos Filamentosos: Aplicaciones Biotecnológicas y Medioambientales". Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense Curso organizado en colaboración con la Dra Covadonga Vázquez, 1998.
Red Temática Biotecnología-CICYT: "Biodegradación de la lignina y l Hemicelulosa: Aspectos químicos, Enzimáticos y Moleculares y sus Aplicaciones Industriales y medioambientales, 1997-1998.

— **Francisco Javier Medina Díaz**
Presidente de una sesión en el *Nucleolus Colloquium*, Wye College, Kent, Reino Unido, 1998.
Miembro del Comité Científico, Ponente Invitado y Presidente de una sesión en el VII Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular, Córdoba, 1997.

— **Flora de Pablo Dávila**
4th International Symposium on insulin-like growth factors, (Scientific Committee member). Tokyo, Japan. Octubre, 1997.
Coordinadora del curso de Doctorado: "Proliferación y diferenciación celulares y desarrollo" del Departamento. de Biología Celular y del Desarrollo del CIB, en colaboración con la Universidades Complutense, Autónoma de Madrid y de Alcalá de Henares. Febrero-Marzo, 1998.

— **María del Carmen Risueño Almeida**
En el 14th *International Congress on Electron Microscopy*, Cancún, Méjico, Septiembre, 1998:
"*Tutorial course*", In situ *hybridization in plants at electron and confocal microscopies*. Miembro del "*International Advisory Commitee*", como "*Special Advisor*".
Organizadora y "*Chairperson*" del Symposio "*Advances in Microscopy of Plant Biology, and Electron Microscopy of Natural Resources*".
Miembro del Comité Científico del Congreso de la Asociación de Palinólogos de Lengua Española, APLE, León, Septiembre, 1998.

— **Maria del Carmen Risueño y Pilar S. Testillano**
Curso en el Centro de Investigaciones Biológicas, "Curso práctico de criométodos aplicados a identificación molecular *in situ*". Madrid, Marzo, 1998.

— **Luis I. Rivas López**
Curso de Doctorado: Parasitología Molecular. Universidad Complutense de Madrid. Febrero-Abril, 1997.
Curso de Doctorado Parasitología Molecular. Universidad Complutense de Madrid. Febrero-Abril, 1998.

— **Santiago Rodríguez de Córdoba**
Congreso Internacional "6th *European Meeting on Complement in Human Disease*", Innsbruck (Austria). Marzo,1997.
Curso Internacional "*Complement in Human Disease*", Paris. Abril, 1998.
Simposio Internacional "*Inborn errors of metabolism: Disroders of phenylalanine and tyrosine catabolism*" Fundación ARECES, Madrid, Octubre 13-14, 1998.

— **Sylvia Rodríguez Saint-Jean**
"Actualización en técnicas diagnósticas en patología de peces". Facultad Ciencias Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Programa de Cooperación Científica con Iberoamérica. Octubre, 1997.

Aula de Seminarios
Seminars

Coodinador: PEDRO J. APARICIO
Secretaria: Mª VICTORIA LAFITA

1997

Prof. Dr. Kurt Messner & Dr. Ewald Srebotnik
Institut für Biochesmiche Technologie und Mikrobiologie, Wien, Österreich, AUSTRIA
Introduction: Strategies to study the lignin biodegradation
Novel polymeric lignin model compounds as tool to study the reactions initiating the depolymerization of lignin by white rot fungi

Dr. Mark Ginsberg, MD
Department of Vascular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA
Dynamic Regulation of Integrins

Dr. Francisco Ramírez
Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, UK
Efecto de glucocorticoides en la síntesis de citoquinas

Prof. Liisa Viikari
VTT Biotechnology and Food Research, Finland
Enzymes for pulp and paper industry

Dr. Ronald Laskey
Wellcome/CRC Institute, Cambridge, Reino Unido
Regulatory roles of the nuclear membrane

Dr. Joel Huberman
Department of Molecular & Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York, USA
Eukaryotic DNA replication origins

Dr. Howard Cedar
Department of Cellular Biochemistry, Hebrew University, Jerusalem, ISRAEL
The role of DNA Methylation in Development

Dr. Joan Massagué
Howard Hughes Medical Institute, and Cell Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA
Transmisión de señales TGF-: Paso a paso de la membrana al núcleo

Dra. Michelle Letarte
Divison of Immunology & Cancer Research, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá
Update on endoglin and Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia

Dr. Manuel Fresno
Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid
Control del factor NFB durante la activación de linfocitos T

Prof. Norbel Galanti
Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile
Transcripción y traducción de genes de histonas en Trypanosomátidos

Dr. J.J. López-Moya
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, MADRID
Análisis mutacional en potyvirus de aspectos moleculares implicados en transmisión por áfidos y movimiento en planta

Prof. T. Pirone
College of Agriculture, University of Kentucky, Kentucky, USA
Virion-Helper Component-Aphid Interactions in Potyvirus Transmission

Dra. Dolores Rodríguez
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC - Madrid
Morfogénesis del Virus Vacunal: Identificación y caracterización de proteínas implicadas en la formación de la envuelta viral

Dr. Hannu Sariola
Department of Paediatric Pathology and Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finlandia
Role of GDNF, HGF and TGF1 in kidney morphogenesis

Dra. Teresa Borrás
Department of Ophthalmology, Duke University Eye Center, USA
Terapia genética: Uso de los vectores de Adenovirus para regular la fisiología ocular

Dr. David Ish-Horowicz
Developmental Genetics Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, Londres, UK
Control of cell commitment and cell-fate diversification during vertebrate neurogenesis

Marc S. Lewis, Ph. D.
Analytical Ultracentrifugation Resource, National Center for Research Resources, National Institutes of Health, Bethesda, USA
Association of Anthrax Protective Antigen and Lethal Factor: Ultracentrifugal Analysis

Dr. Geoff J. Howlett
Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Melbourne, Victoria, Australia
Analysis of the interactions of the regulatory protein TyrR with DNA

Prof. Juan C. Zabala
Dpartamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria
Plegamiento de proteínas citoplásmicas: Tubulinas

Dra. Eva Nogales
Lawrence Berkeley National Laboratory, UC Berkeley USA
Estructura del dímero de tubulina

Prof. D. Harvey
Instituto de Glicobiología, Departamento de Bioquímica, Universidad de Oxford, UK
Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry and its application to the analysis of carbohydrates and glycoproteins

Prof. Martin J. Humphries
School of Biological Sciences, University of Manchester, UK
The '97 Integrin Model: Overhead Cell Adhesion Molecules, Unleaded Fuel, and a Single Propeller

Dr. Jaime Sancho
Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Granada
Transducción de señales mediada por CD3 y CD38 en linfocitos T

Prof. Maurizio Simmaco
Universitá de Chieti, Italia
Antibiotic peptides from Amphibian skin secretions

Dr. Miguel Angel Peñalva Soto
CIB, CSIC, Madrid
La base molecular de la Alcaptonuria

Dr. Lluis Montoliu
CNB / CSIC, Madrid
Una LCR (Locus Control region) en el gen de la tirosinasa: utilización de YACs en ratones transgénicos

Dra. María Herrero
Servicio de Investigaciones Agrarias, Diputación General de Zaragoza
Erótica y evolución en plantas

Dra. Martine Couturier
Universidad Libre de Bruselas, Bélgica
The ccd programmed cell death system of mini-F: what's new

Prof. Xavier Bellés
Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC, Barcelona
Los extraños caminos del viviparismo, Disección fisiológica y molecular en el caso de las cucarachas

Dr. Diego de Mendoza
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceúticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina
Mecanismos moleculares de regulación de la fluidez de los lípidos de membrana por la tempertura de crecimiento en bacterias

Dra. Mª Jesús Ruiz Echevarría
Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Robert Nood Johnson Medical School, NJ, USA
Mecanismos de degradación de RNAs mensajeros en células eucariotas: Papel de la traducción en este proceso

Dr. Yen Choo
Laboratory of Molecular Biology, MRC, Cambridge, UK
Design of sequence-specific zinc finger DNA-binding proteins

Dr. Eduardo Rial
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid
La regulación de la eficiencia energética en levaduras: el ATP como desacoplante

Prof. Lynn Margulis
Department of Geosciences, University of Massachusetts, USA
Simbiosis y origen bacteriano de orgánulos

Prof. René Etcheberrigaray
Georgetown University Medical Center, Washington, USA
Alteraciones celulares y moleculares en la enfermedad de Alzheimer: Estudios en fibroblastos

Prof. José Carlos García Borrón
Facultad de Medicina, Universidad de Murcia
Regulación de la melanogénesis

Prof. Salvador Moncada
University College London, Cruciform Project, London, UK
An update on the L-arginine: nitric oxide pathway

Prof. Matthias W. Hentze
Gene Expression Programme, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany
Molecular control of mammalian iron metabolism: posttranscriptional control circuits regulated by iron, nitric oxide and oxidative stress

Dr. E. Gwyn Jordan
Molecular Biology, King's College London, UK
Nucleolar function and structure - a paradigm for transcription and processing?

Dr. Carlos Martínez
Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid
El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) como modelo de inmunología

Prof. Dr. Oriol Suñer
Department of Pathology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA
Diversidad y evolución del sistema de complemento

Prof. Sebastian Alberti
Departamento de Biología Ambiental, Universidad Islas Baleares, Palma de Mallorca
Regulación genética de la expresión de la cápsula en Streptococco Grupo A

Dr. José Alberto García
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid
Translational control: A general mechanism of gene regulation during T cell activation

Prof. Emilio Muñoz
IESA (CSIC), Madrid
Conocimiento y nueva Política Científica. El caso de la Biotecnología

Prof. Nicholas Glaichenhaus
Institut de Pharmacologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS, Université de Nize, FRANCIA
Parasite-specific T-cells in murine Leishmaniasis

1998

Dr. Felipe Prosper
Hospital Clínico Universitario, Valencia
Mecanismos de movilización y anidamiento de progenitores hematopoyéticos

Dr. Guido Tarone
Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, Università di Torino, Italia
Beta 1 integrin signalling in cytoskeleton organization and growth control

Dra. Elisabetta Dejana
Instituto di Recerche Farmacologiche Mario Negri, Milan, Italia
The molecular organization and functional role of intercellular junctions in the endothelium

Dr. Andrew T. Smith
School of Biological Sciences, University of Sussex, UK
Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed

Dr. Ralf Wellinger
Institute of Cell Biology, ETH - Honggerberg, Switzerland
"In vivo" mapping of replicating chromatin by psoralen cross-linking and primer extension: positioned nucleosomes at the replication fork

Prof. Martin Raff
University College London, UK
"Timing and cell number control in development"

Dra. Flora de Pablo
CIB, (CSIC) Madrid
Algo más que Diabetes del cerebro

Dr. Andrew Kraliceck
Research School of Chemistry, Australian National University, Camberra, Australia
In vitro evolution of protein function by ribosome display

Prof. Jürgen Engel,
Department of Biophysical Chemistry, Biozentrum, Basel University, Basel, Suiza
Molecular mechanism of the homophilic adhesion of E-cadherin

Dr. Michel Bornens
Institut Curie, UMR 144 du CNRS, Paris
Centrosome from animal cells: biogenesis and activity

Prof. Caroline S. Harwood
Department of Microbiology, The University of Iowa, Iowa City, USA
Molecular inroads into anaerobic benzene ring biodegradation

Dr. Jan Löwe
MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, UK
The bacterial tubulin homolog: structure of FtsZ

Prof. Robley Williams
Vanderbilt University, Nashville, Tennesse, USA
Tubulin and Microtubule Dynamics

Dr. Oreste Acuto
Department of Immunology, Institut Pasteur, Paris
Regulation of TCR signaling by protein tyrosine kinases and CD28

Prof. Catherine M. Verfaillie
University of Minnesota, Minneapolis, USA
Role of Adhesion in Hematopoiesis

Prof. Yechiel Shai, PhD
Department of Biological Chemistry, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
Molecular recognition within the membrane milieu: implication to the structure and function of membrane proteins

Prof. Miguel Lafarga
Departamento de Anatomía y Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria
Bases celulares de la organización de la maquinaria de splicing y edición de RNAs en modelos neuronales

Dr. Peter Shaw
Department of Cell Biology, John Innes Institute
Nuclear organization in interphase and during meiosis

Dra. Adela G. de la Campa
Instituto Carlos III, Madrid
Los DNA topoisomerasas de Streptococcus pneumoniae como blanco de acción de antimicrobianos

Prof. Yves Brun
Department of Biology, Indiana University, USA
Regulation of cell division and differentiation in Caulobacter

Prof. Dr. F. Ulrich Hartl
Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Zelluläre Biochemie, GERMANY
Mechanisms of protein folding in vivo

Dr. Santiago Ramón y Cajal
Clínica Puerta de Hierro, Madrid
Aplicaciones del gen e1a y de Adenovirus e1b defectivos en patología tumoral

Prof. Javier León
Departamento de Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander
Los factores de transcripción oncogénicos c-Myc y Spi1/PU.1 en la diferenciación de células de leucemia mieloide

Prof. Marcelo G. Kazanietz
Center for Experimental Therapeutics, University of Pennsylvania, USA
Protein kinasa C (PKC) y otros receptores para los esteres del forbol y el segundo mensajero diacilglicerol

Dr. A. Krishna Kumaran
Department of Biology, Marquette University, Milwaukee, USA
Regulation of storage protein genes in lepidopteran insects

Prof. Olivier Hyrien
Genética Molecular, École Normale Superieure, Paris, Francia
Chromosome replication in Xenopus: developmental transitions, role of topoisomerase II

Prof. Ian Max Mller
Departament of Plant Physiology, Lund University, Suecia
The role of NADP in plant respiration

Dra. María Jesús Santesmases
Instituto de Estudios Sociales Avanzados, CSIC, Madrid
Los primeros años del CIB: reflexiones sobre una transformación

Dr. Walter G. Zumft
Universidad de Karlsruhe, Alemania
Bacterial metabolism of nitric oxide

Dr. B. K. Mohanty
Department of Microbiology, Duke University, Medical Center, Durham, North Carolina, USA
Mechanisms for completing DNA replication

Dr. Marc Lemonnier
Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular, CNRS, FRANCIA
Disección de un centrómero procariótico mediante una aproximación basada en interferencia de péptidos

Prof. Javier García Sancho
Instituto de Biología y Genética Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid / CSIC
Control de la secreción adenohipofisaria por los factores liberadores hipotalámicos

Prof. Francisco Montero
Departamento de Bioquímica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense, Madrid
El tiempo de respuesta en rutas metabólicas: problemática y generalización

Dr. Pedro Sánchez Lazo
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo
Caracterización del efecto citotóxico del TNF en células no transformadas

Dra. Mª Teresa Miras
Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid
Nucleótidos y dinucleótidos de adenina como neurotransmisores

Dr. Antonio López Farré
Fundación Jiménez Díaz, Madrid
Caracterización de una proteína que interacciona con el RNA mensajero de la oxido nítrico sintasa endotelial

Prof. Bettie Sue Masters
University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA
Unique Structural Aspects Of Nitric Oxide Synthases Which Determine Functionality

Dr. Xavier Estivill
Centre de Genètica Mèdica y Molecular, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona
La Genética de la Sordera

Prof. B. Paul Morgan
University of Wales College of Medicine, Cardiff, UK
Membrane regulators of the complement system, role in homeostasis and relevance to disease

Prof. Anne Millner
University of Birmingham, UK
The Regulation of Apoptosis in B cells

Profs. Juan Pérez Mercader y Emilio Muñoz
ACTO CONMEMORATIVO: En recuerdo de nuestro amigo Alberto Marquet

Dra. Elena Beccari
Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma "La Sapienza", Roma
Zinc-finger protein binding to the first exon of L1 and L2 ribosomal protein genes

Prof. Martin Raff
University College London, UK
Timing and cell number control in development

Agradecemos la colaboración de Anaya, Becton & Dickinson y Bio-Rad.

Personal de Servicios

Dirección

Director: Juan M. Ramírez de Verger Lobo
Vicedirectores: Mª Elena Fernández-Tresguerres Rodríguez-Vigil
Pablo Hernández Valenzuela
Angel T. Martínez Ferrer

Secretaría: Ana Chao Vázquez

Gerencia

Gerente: Germán Lerma Rodrigo

Luis García Trujillo

Administración

Administrador: Ángel Abril Novella

Julia Anades Besnard
Concepción Chorro de Villaceballos
Estrella González Herradura
Nieves González 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
Mª Teresa Ramos Jiménez
Francisco Serrano Coronado

Servicios Generales

Conserjería

Javier de La Flor Hernández
Diego García Herranz
Lucía González Díaz
Celia López Adsuara
J. Manuel Martín Sierra

Limpieza de Material y Lavandería

Blasa Carrión Fernández
Sara Fuentes Romero
Amparo García Moreno
Felicidad Lara Martínez
Carmen López Castellanos
Maria López Ramirez
María López Romera
Francisca Morante González
Bárbara Moreno Jiménez
Soledad Pastor Encabo

Comedor

Beatriz Fraile Fernández
Angela Muñoz Alonso
Dolores Portero Laula
Encarnación Sánchez Ruiz
Felina Somolinos García

Franqueo José M. Gordillo Rodríguez

Vigilancia

Lorenzo Montero Vera
Domingo Muriel Muñoz
Antonio Moreno Calle

Servicio Técnico

Jefe de S. Técnico:
ANTONIO M. GARCÍA ÁLVAREZ

LORENZO ALONSO MACARRÓN
ANGEL ARRANZ BOMBÍN
JOSÉ CABAÑAS OLIVARES
ANGEL GUERRERO RIVERO
Mª JOSÉ HERNÁNDEZ PARADELO
JOSÉ Mª 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 Mª FONTENLA LAGO
VICTORIA MUÑOZ MARTÍN

Informática JOSÉ MANUEL ANGULO ZAPATERO

Aplicaciones Informáticas

Responsable Científico: DR. ANTONIO ROMERO
DR. F. JAVIER MEDINA

MARIO GARÍA LACOBA

Servicios Especiales

Microscopía Electrónica

Responsable Científico: DRA. CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA

Mª DOLORES GUIRAO REY

Animalario

Responsable Científico: DR. J. MARÍA ROJO HERNÁNDEZ

DIEGO DÍAZ IZQUIERDO
GABINO GARCÍA AMAYA
FRANCISCO JOSÉ GARCÍA GONZÁLEZ
MANUEL MORENO CALLE

Cromatografía

Responsable Científico: DR. JUAN ANTONIO LEAL OJEDA

ALICIA PRIETO ORZANCO

Cultivo de Células Animales y Esterilización

Responsable Científico: DR. AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ

BLANCA PÉREZ MACEDA
ALEJANDRA MARTÍN RUIZ
ROSA DÍAZ LÓPEZ

Química de Proteínas

Responsable Científico: PROF. GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO

JOSÉ JAVIER VARELA ESPINOSA
EMILIA APORTA SOSA

Citometría de Flujo

Responsable Científico: DR. TEIXIDÓ CALVO

PEDRO LASTRES VARO

Microscopía Confocal

Responsable Científico: Dra. Mª Carmen Risueño Almeida

Mª Angeles Ollacarizqueta Donazar

Ultracentrifugación Analítica

Responsable Científico: Dr. Germán Rivas Caballero

Carlos Alfonso Botello

Secuenciación Automática de DNA

Responsable Científico: Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba y
Dr. José Luis García López

Sonia Carbajo García
Asunción Díaz Carrascosa
Mª Gracia Porras Franco

Espectroscopía

Responsable Científico: Prof. Juan Manuel Ramírez de Verger

Protección Radiológica

Responsable Científico: Dr. Eduardo Rial Zueco

Marta Cebrián Echarri
Mª del Carmen Doñoro Vázquez

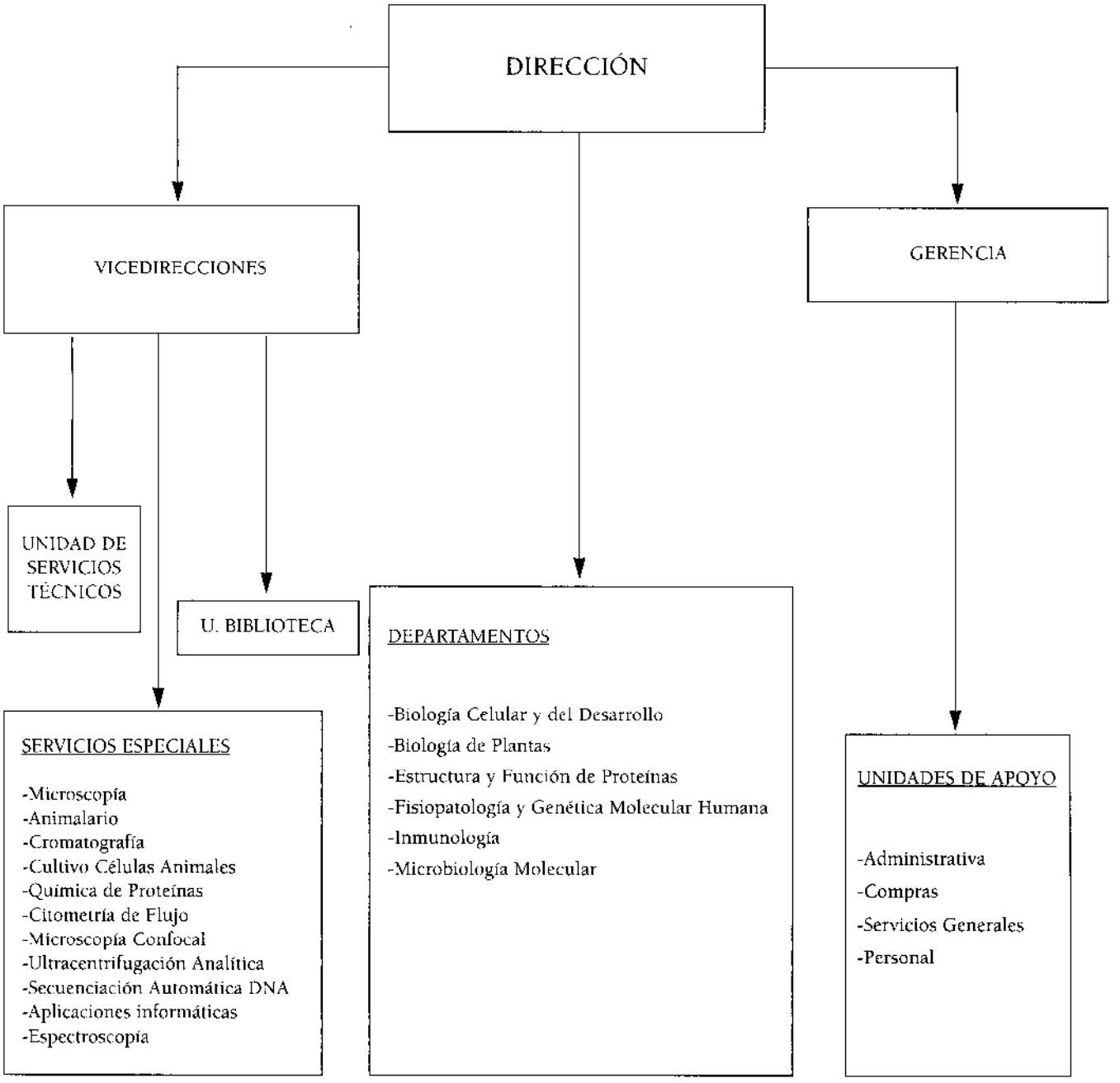
Biblioteca

Evencio Cabrerizo de las Heras
Consolación Gordillo Salamanca
Angeles Sacristán Martín
Mª Teresa Silió Martínez
J. Miguel Soto Estébanez
Mª Jesús Vilela Manrique

Reprografía

Mª Jesús Garabito Seco

ORGANIGRAMA CIB



Jubilaciones, Altas y Bajas de Personal

Jubilaciones

Fernández Ortíz, Purificación
Hermida González, Mª Antonia
Liébana Allende, Emiliana
Marcilla Cavanillas, Mª Pilar
Martínez Pardo, Mª Teresa
Meseguer Fabregat, Luisa
Rodríguez Muñoz, Mª del Carmen
Romero Orihuel, Julián
Santiago Rojo, José
Toribio Toribio, Ezequiel
Vilas Minondo, Mª Pilar

Fallecimiento

Marquet Espinosa, Alberto

Traslados

Galán Iglesias, Remedios
Queijá Pérez, Fco. José
Valiente Martínez, Pedro

Altas 1997- 1998

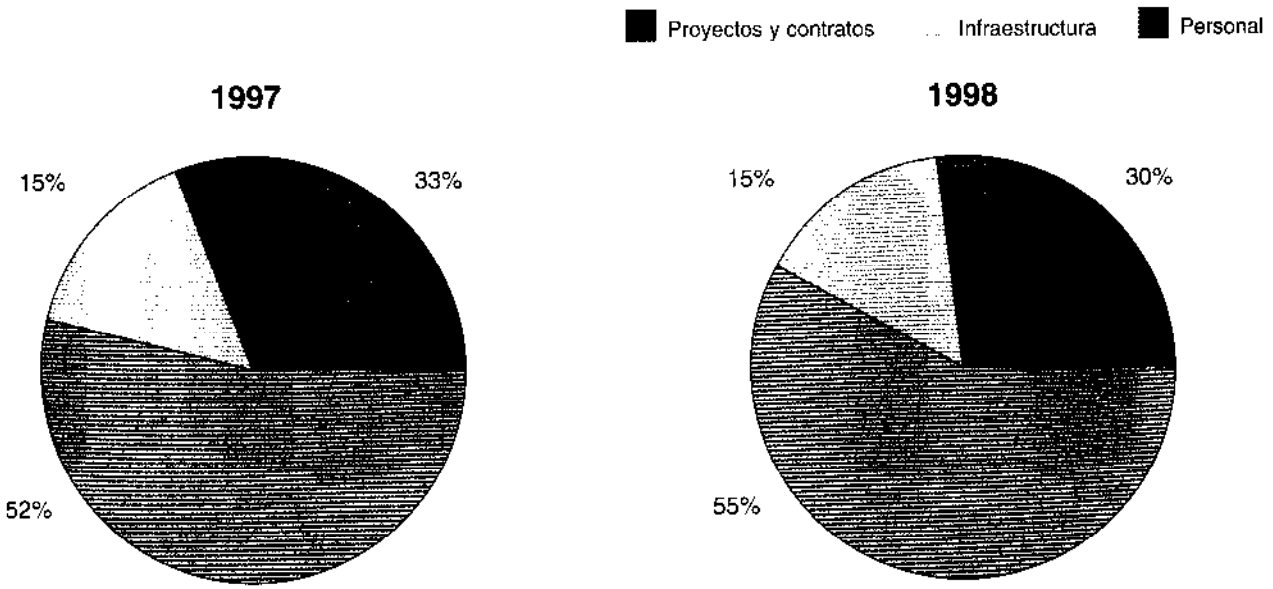
Alfonso Botello, Carlos
García Moreno, Amparo
Gordillo Salamanca, Consolación
López Adsuara, Celia
Molina Morente, Manuel
Ortego Alonso, Félix
Romero Garrido, Antonio
Sánchez Testillano, Pilar
Suárez González, Mª Teresa Margarita

RESUMEN DE DATOS ECONÓMICOS

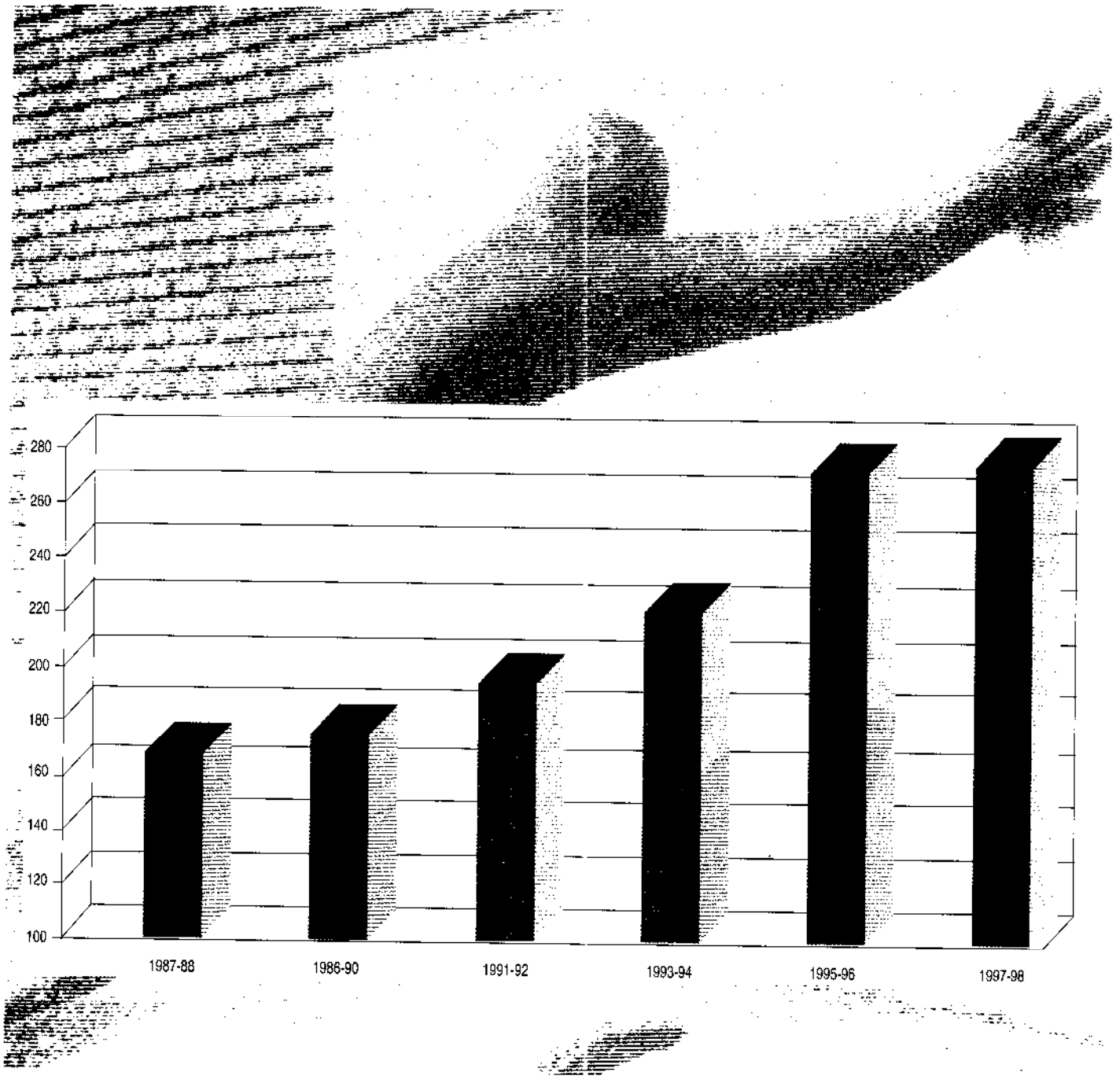
PRESUPUESTO DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Concepto	1997	1998
Presupuesto ordinario	95.968	106.226
Inversiones	59.872	37.266
Apoyo a la infraestructura	122.465	144.650
Explotación del comercio	25.165	23.924
TOTAL DE INFRAESTRUCTURA DEL CENTRO	303.470	312.066
Proyectos P. Nacional, P.G.M. y C.A.M.	337.105	434.052
Proyectos FIS y contratos con empresas	79.166	94.248
Proyectos de la Unión Europea	175.147	165.425
Asistencia Técnica	964	2.156
TOTAL PROYECTOS, CONTRATOS Y ASISTENCIA TÉCNICA	592.382	695.881
PERSONAL	1.082.028	1.093.362
TOTAL	1.977.880	2.101.309

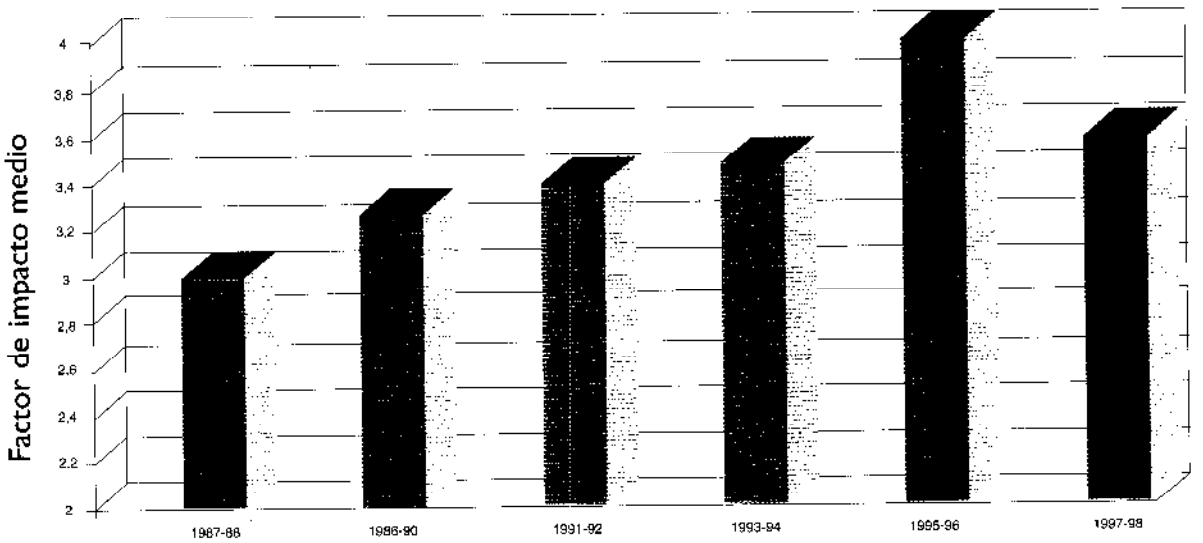
En miles de pesetas



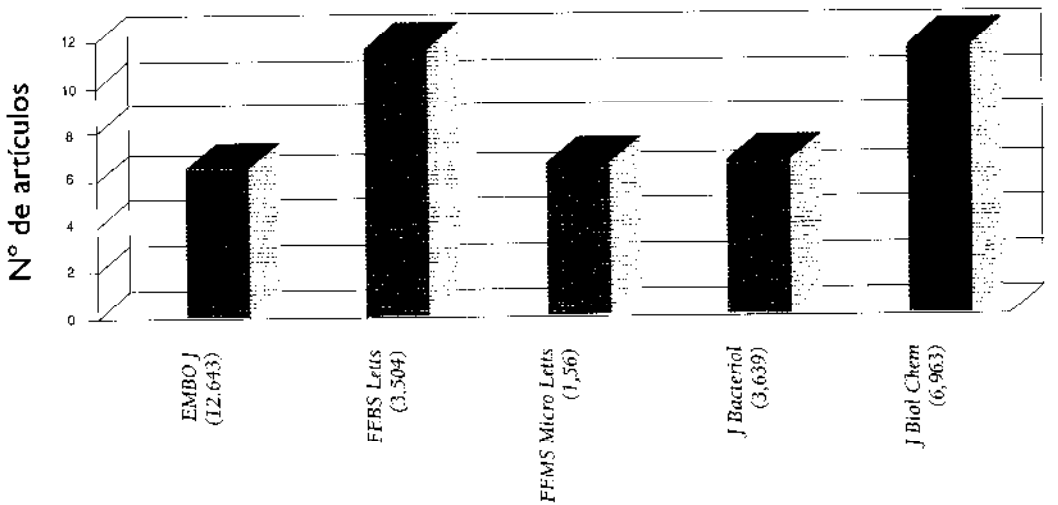
EVOLUCIÓN DEL NÚMERO DE PUBLICACIONES Y SU IMPACTO



Evolución del Factor de Impacto medio de las revistas utilizadas



Revistas en las que los investigadores del CIB publicaron más frecuentemente en 1997-1998



Índice de Investigadores en Plantilla

Nombre	Categoria	Departamento	E-mail	Tlf. -ext.	Página
– ABRISQUETA ZARRABE, José Antonio	Invest. Cient.	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	abrisqueta@cib.csic.es	91 562 0307	109
– ALLER TRESGUERRES, Patricio	Cient.Titular	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	aller@cib.csic.es	4247	13
– ANDREU MORALES, José M.	Prof. Invest.	Dpt° Estruct. y Func. de Proteinas	j.m.andreu@cib.csic.es	4381	90
– APARICIO ALONSO, Pedro J.	Prof. Invest.	Dpt° Estruct. y Func. de Proteinas	pjaparicio@cib.csic.es	4363	101
– BARASOAIN BLASCO, Isabel	Cient.Titular	Dpt° Inmunología	i.barasoain@cib.csic.es	4216	139
– BERNABÉU QUIRANTE, Carmelo	Invest. Cient.	Dpt° Inmunología	bernabeu.c@cib.csic.es	4246	131
– BOTELLA CUBELLS, Luisa Mª	Cient.Titular	Dpt° Inmunología	cibluisa@cib.csic.es	4312	131
– CASADO MORAGÓN, Angela	Cient.Titular	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	acasado@cib.csic.es	4219	111
– CASTAÑERA DOMÍNGUEZ, Pedro	Prof. Invest.	Dpt° Biología de Plantas	castan@cib.csic.es	4264	64
– De PABLO DÁVILA, Flora	Invest. Cient.	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	fdepablo@cib.csic.es	4360	39
– Del MAZO MARTÍNEZ, Jesús	Cient.Titular	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	jdelmazo@cib.csic.es	4324	37
– De la HERA MARTÍNEZ, Antonio N.	Invest. Cient.	Dpt° Inmunología	adelahera@cib.csic.es	4394	141
– De la ROSA CANO, Enrique J.	Cient.Titular	Dpt° Biología Cel. y del DesarrolloS	ejdelarosa@cib.csic.es	4274	39
– De la TORRE GARCÍA-QUINTANA, Consuelo	Prof. Invest.	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	delatorrec@cib.csic.es	4307	9
– DÍAZ FERNÁNDEZ, Eduardo	Cient.Titular	Dpt°Microbiología Molecular	ediaz@cib.csic.es	4426	167
– DÍAZ OREJAS, Ramón	Invest. Cient.	Dpt° Microbiología Molecular	ramondiaz@cib.csic.es	4351	178
– DÍAZ RUIZ, José Ramón	Prof. Invest.	Dpt° Biología de Plantas	jrdiazruiz@cib.csic.es	4406	62
– DÍEZ CORTÉS, José Luis	Invest. Cient.	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	jldiez@cib.csic.es	4311	25
– ESPINOSA PADRÓN, Manuel	Prof. Invest.	Dpt° Estruct. y Func. de Proteinas	mespinosa@cib.csic.es	4209	97
– ESPONDA FERNÁNDEZ, Pedro H.	Invest. Cient.	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	esponda@cib.csic.es	4336	37
– FERNÁNDEZ GÓMEZ, Mª Encarnación	Invest. Cient.	Dpt° Biología de Plantas	mefernandez@cib.csic.es	4259	44
– FERNÁNDEZ-TRESGUERRES, Mª Elena	Cient.Titular	Dpt° Microbiología Molecular	etresguerres@cib.csic.es	4353	181
– GARCÍA GONZÁLEZ, Pedro A.	Cient.Titular	Dpt° Microbiología Molecular	pgarcia@cib.csic.es	4428	167
– GARCÍA HERMIDA, Ofelia	Cient.Titular	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	ofeliagh@cib.csic.es	4355	114
– GARCÍA LÓPEZ, Ernesto A.	Prof. Invest.	Dpt° Microbiología Molecular	e.garcia@cib.csic.es	4428	167
– GARCÍA LÓPEZ, José Luis	Invest. Cient.	Dpt° Microbiología Molecular	jlgarcia@cib.csic.es	4418	167
– GARCÍA LUQUE, Isabel	Cient.Titular	Dpt° Biología de Plantas	igarcia@cib.csic.es	4410	59
– GARCÍA MENDOZA, Concepción	Invest. Cient.	Dpt° Microbiología Molecular	cgm@cib.csic.es	4262	157
– GARCÍA PARDO, Mª de los Angeles	Invest. Cient.	Dpt° Inmunología	agarciapardo@cib.csic.es	4430	124
– GIMÉNEZ GALLEGO, Guillermo	Prof. Invest.	Dpt° Estruct. y Func. de Proteinas	gimenez_gallego@cib.csic.es	4378	80
– GODAY BAYLINA, Clara	Cient.Titular	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	godaylab@cib.csic.es	4314	22
– GÓMEZ ALARCÓN, Gonzalo	Cient.Titular	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	alarcon@cib.csic.es	4269	117
– GONZÁLEZ BECERRA, Aldo E.	Cient.Titular	Dpt° Microbiología Molecular	aldo@cib.csic.es	4414	181
– GONZÁLEZ MANCHÓN, Consuelo	Cient.Titular	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	cgmanchon@cib.csic.es	4441	114

Nombre	Categoría	Departamento	E-mail	Tlf. -ext.	página
– GUTIÉRREZ RUEDA, Mª del Carmen	Cient.Titular	Dpt° Microbiología Molecular		4386	160
– HERNÁNDEZ VALENZUELA, Pablo	Cient.Titular	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	p.hernandez@cib.csic.es	4232	5
– JAREÑO CAÑADA, Mª Asunción	Cient.Titular	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.		4395	114
– KRIMER SMUNIS, Dora B.	Cient.Titular	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	dbkrimer@cib.csic.es	4238	5
– LAMAS PELÁEZ, Santiago	Cient.Titular	Dpt° Estruct. y Func. de Proteínas	slamas@cib.csic.es	4302	74
– LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA, Vicente	E.Prof. Invest.	Dpt° Estruct. y Func. de Proteínas	vlarraga@cib.csic.es	4207	95
– LEAL OJEDA, J. Antonio	Invest. Cient.	Dpt° Microbiología Molecular	aleal@cib.csic.es	4437	163
– LÓPEZ ABELLA, Dionisio	Prof. Invest.	Dpt° Biología de Plantas	dlabella@cib.csic.es	4404	62
– LÓPEZ GARCÍA, Paloma	Invest. Cient.	Dpt° Estruct. y Func. de Proteínas	plg@cib.csic.es	4203	83
– LÓPEZ GARCÍA, Rubens	Prof. Invest.	Dpt° Microbiología Molecular	ruben@cib.csic.es	4428	167
– MARTÍN GONZÁLEZ, Antonio	Invest. Cient.	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.		4436	108
– MARTÍN REQUERO, Mª Angeles	Cient.Titular	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	amrequero@cib.csic.es	4224	114
– MARTÍNEZ FERRER, Angel T.	Invest. Cient.	Dpt° Microbiología Molecular	atmartinez@cib.csic.es	4407	152
– MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, Mª Jesús	Cient.Titular	Dpt° Microbiología Molecular	mjmartinez@cib.csic.es	4439	152
– MEDINA DÍAZ, Fco. Javier	Cient.Titular	Dpt° Biología de Plantas	fjmedina@cib.csic.es	4261	49
– MORENO DÍAZ DE LA ESPINA, Susana	Cient.Titular	Dpt° Biología de Plantas	smoreno@cib.csic.es	4257	44
– ORTEGO ALONSO, Félix	Cient.Titular	Dpt° Biología de Plantas	ortego@cib.csic.es	4266	64
– PÁEZ ABRIL, Eduardo	Cient.Titular	Dpt° Inmunología	epaez@cib.csic.es	4387	149
– PARRILLA SÁNCHEZ, Roberto L.	Prof. Invest.	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	rparrilla@cib.csic.es	4204	114
– PEÑALVA SOTO, Miguel A.	Invest.Cient.	Dpt° Microbiología Molecular	penalva@cib.csic.es	4358	174
– PÉREZ PRIETO, Sara Isabel	Tit.Sup.Esp.	Dpt° Microbiología Molecular	saraip@cib.csic.es	4385	160
– RAMÍREZ DE VERGER LOBO, Juan M.	Prof. Invest.	Dpt° Estruct. y Func. de Proteínas	jmramirez@cib.csic.es	4369	80
– REY CAMPOS, Fco. Javier	Cient.Titular	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	javier.rey@cib.csic.es	4416	19
– RIAL ZUECO, Eduardo	Cient.Titular	Dpt° Estruct. y Func. de Proteínas	rial@cib.csic.es	4236	77
– RISUEÑO ALMEIDA, Mª del Carmen	Invest. Cient.	Dpt° Biología de Plantas	risueno@cib.csic.es	4230	54
– RIVAS CABALLERO, Germán	Cient.Titular	Dpt° Estruct. y Func. de Proteínas	grivas@cib.csic.es	4304	104
– RIVAS LÓPEZ, Luis I.	Cient.Titular	Dpt° Estruct. y Func. de Proteínas	luis_rivas@cib.csic.es	4234	78
– ROBLES CHILLIDA, Elías M.	Cient.Titular	Dpt° Biología de Plantas		4275	69
– RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, Santiago	Invest. Cient.	Dpt° Inmunología	srdecordoba@cib.csic.es	4432	144
– RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, Ramón B.	Cient.Titular	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.	rbrod@cib.csic.es	4223	114
– RODRÍGUEZ MURCIA, Carlos	Invest. Cient.	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.		915627622	109
– RODRÍGUEZ SAINT-JEAN, Silvia	Tit.Sup.Esp.	Dpt° Microbiología Molecular	sylvia@cib.csic.es	4384	160
– ROJO HERNÁNDEZ, José María	Invest. Cient.	Dpt° Inmunología	jmrojo@cib.csic.es	4217	120
– ROMERO GARRIDO, Antonio	Cient.Titular	Dpt° Estruct. y Func. de Proteínas	romero@cib.csic.es	4244	80

Nombre	Categoría	Departamento	E-mail	Tlf. -ext.	página
– SÁNCHEZ AYUSO, Matilde	Invest.Cient.	Dpt° Fisiopatol. y Genét.Mol.Hum.		4225	
– SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, Lucas	Invest. Cient.	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	lsanchez@cib.csic.es	4322	28
– SÁNCHEZ TESTILLANO, Pilar	Cient.Titular	Dpt° Biología de Plantas	testillano@cib.csic.es	4365	54
– SCHVARTZMAN BLINDER J. Bernardo	Invest. Cient.	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	schvartzman@cib.csic.es	4233	5
– SERRA YOLDI, Mª Teresa	Cient.Titular	Dpt° Biología de Plantas	mserra@cib.csic.es	4411	59
– SILVA GONZÁLEZ, Augusto	Cient.Titular	Dpt° Inmunología	asilva@cib.csic.es	4431	135
– SUÁREZ GONZÁLEZ, Mª Teresa	Cient.Titular	Dpt° Microbiología Molecular	teresa@cib.csic.es	4227	174
– TEIXIDÓ CALVO, Joaquín	Cient.Titular	Dpt° Inmunología	joaquint@cib.csic.es	4392	127
– TORROJA CAVANILLAS, Eduardo	Invest. Cient.	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo		4323	
– VIDAL CABALLERO, Miguel A.	Cient.Titular	Dpt° Biología Cel. y del Desarrollo	mvidal@cib.csic.es	4382	16

(NOTA: El listado telefónico incluye los cuatro dígitos de la extensión cuando se marca la centralita del CIB, 561-18-00 salvo líneas directas indicadas por nueve dígitos)