

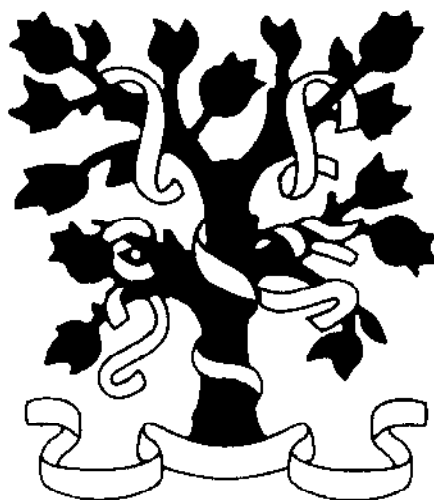
Centro de Investigaciones Biológicas

2001/2002



MEMORIA CIENTÍFICA 2001/2002

Centro de Investigaciones Biológicas



CSIC

Ramiro de Maeztu, 9 - 28040 Madrid, España

Teléfono: (34) 91 837 3112

Fax: (34) 91 536 0432

Cubierta
Cover

Fotografía derecha

Cultivo primario de células de Sertoli. (Dr. Jesús del Mazo)

Right picture

Primary culture of Sertoli cells. (Dr. Jesús del Mazo)

Recuadro

Evidencia de la localización exclusivamente polar de la glucosaminidasa LytB de *Streptococcus pneumoniae* utilizando una proteína de fusión GFP-LytB.GFP: green fluorescent protein. (Blanca de las Rivas, Dr. José Luis García, Dr. Rubens López, y Dr. Pedro García)

Insert:

Evidence on polar localization of the glucosaminidase LytB using the translational fusion between GFP (green fluorescent protein) and the mature form of LytB. (Blanca de las Rivas, Dr. José Luis García, Dr. Rubens López, y Dr. Pedro García)

Fondo: Estatua sita en el edificio del CIB

Background: *Sculpture located at the CIB building*

Coordinación Editorial: M^a Victoria Lafita
Fco. Javier Medina
Félix Ortego

Agradecimientos: A Mónica M^a Fontela Lago, Victoria Muñoz Martín y a M^a Teresa Silió Martínez

Impresión y Maquetación: P.G.M.

TABLA DE CONTENIDOS

— Recuerdos del CIB	V
— Dpto. de Biología Celular y del Desarrollo	1
Biología Molecular de los Cromosomas	2
Reproducción Celular	9
Estrés y Muerte Celular	13
Regulación de Expresión de Genes Eucariotas	16
Control Transcripcional en Eucariotas	20
Eliminación de Cromosomas en Insectos	25
Citogenética Molecular	27
Evolución de los Mecanismos de Determinación Sexual en Insectos	30
Biología Molecular de la Gametogénesis	34
Biología de la Reproducción	38
Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados	42
— Dpto. de biología de Plantas	47
Matriz Nuclear y Regulación de la Organización y Funcionalidad Nuclear	48
Nucleolo de Células Vegetales	56
Desarrollo de Plantas y Organización Nuclear	62
Patogénesis de Virus de Plantas y Mecanismos de Resistencia en Plantas	70
Virología Molecular de Plantas	73
Interacciones Planta-Insecto	80
— Dpto. de Fisiopatología y Genética Molecular Humana	85
Fijación directa del N ₂	86
Genética Humana	88
Biomarcadores de Estrés Oxidativo y Procesos de Envejecimiento	90
Metabolismo y Patología Molecular	93
— Dpto. de Estructura y Función de Proteínas	99
Biopatología de la Pared Vascular	100
Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores	105
Biología Estructural de Proteínas	109
Biología Molecular de Bacterias Gram-positivas	117
Biología de Leishmania. Péptidos Antibióticos Eucarióticos	121
FtsZ y Tubulina: Bioquímica, Biofísica y Computación	126
Parasitología Molecular	130
Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-Positivas	135
Energética y Dinámica de Interacciones Macromoleculares	139
(en la División Celular Bacteriana)	
Microscopía Electrónica y Reconstrucción Tridimensional de Macromoléculas	143

— Dpto. de Inmunología	145
Activación de Linfocitos T	146
Adhesión Celular en el Sistema Inmune	152
Biología Celular de las Moléculas de Adhesión	156
Metaloproteinasas de matriz en inflamación	159
Receptores de Membrana	163
Biología de las Células Mieloides	168
Genómica Computacional	172
Terapia del Cáncer: Activación de los Mecanismos de Apoptosis	176
Mecanismos Celulares de Acción de Taxoides	182
Patología Molecular / Genética del Complemento	185
Virología Molecular de Vaccinia	190
— Dpto. de Microbiología Molecular	193
Biodegradación de la Lignina	194
Bioquímica de Hongos	204
Virología en Acuicultura	208
Carbohidratos Microbianos	213
Genética Bacteriana	216
Biotecnología Medioambiental	221
Genética Molecular de Aspergillus	233
Iniciadores de la replicación del DNA y sistemas de muerte condicional en microorganismos	239
Biología Molecular de Hongos Basidiomicetos	243
— Premios y Distinciones	247
— Organización de Congresos y Cursos	250
— Seminarios del Centro	253
— Dirección, Gerencia y Servicios	259
— Organigrama	270
— Altas, Excedencias y Jubilaciones	271
— Resumen de Datos Económicos	272
— Evolución del Número de Publicaciones y su Impacto	273
— Índice Alfabético de Investigadores y Teléfonos	275

RECUERDOS DEL CIB

CIB: EL FUTURO YA ES PRESENTE

César Nombela Cano

Catedrático de la Universidad Complutense

Junio 2003

En pleno cincuentenario del modelo de doble hélice del DNA, constatamos el indudable protagonismo de las ciencias de la vida en el panorama investigador del mundo actual. Suponen más de la mitad de la producción científica mundial, ocupan a un elevado porcentaje de los investigadores y centran la atención de responsables de la política científica, pública y privada, de los principales estados y empresas de todo el mundo.

Se identifican nuevos territorios de exploración en ciencias de la vida, al tiempo que se abren nuevos frentes de avance en los que cabe pensar que se produzcan novedades significativas. Ésta es, sin duda, la razón que hace de esta temática de investigación represente una actividad abierta al futuro. Los aportes metodológicos de otros campos científicos siguen propiciando nuevas posibilidades para la investigación biológica. El recorrido por las clásicas estrategias experimentales *in vivo* e *in vitro*, hoy da paso a los análisis *in silicio*, para el procesamiento de la infinidad de datos que han de dar sentido a la “biología en gran escala”. Es preciso transformar de esta forma en conocimiento la información que genera la genómica, proteómica y demás aproximaciones experimentales –ómicas características del momento actual. A pesar de todo, la investigación sigue siendo tributaria de la capacidad y el esfuerzo de investigadores capaces de formular hipótesis creativas y desarrollar estrategias experimentales inteligentes.

Vienen estos comentarios a propósito de mis recuerdos y vivencias del Centro de Investigaciones Biológicas, que tanto ha significado para la investigación española a lo largo de décadas de su existencia fecunda y adaptada a las demandas de cada momento. Es un período de enorme intensidad que demanda un análisis detallado de lo que ha sido el papel del CIB en beneficio de la mejor investigación española.

En mis años de estudiante de bachillerato en el Instituto Ramiro de Maeztu, no me pasó desapercibida la estatua que

representa a una figura humana “sosteniendo” el ya hoy casi amortizado edificio del CIB. El recorrido cotidiano –finales de los cincuenta y principios de los sesenta- del autobús escolar, saliendo del instituto hacia la calle Pablo Aranda, me proporcionaba diariamente la imagen de ese edificio en el chafflán de las calles Joaquín Costa y Velázquez. Recuerdo que la curiosidad por conocer lo que podía significar un centro científico, en ese lugar de la ciudad, estimulaba también mis preguntas incipientes sobre lo que representa la investigación y sus actores. No era infrecuente ver al personal del CIB pasear por el exterior con sus batas de laboratorio.

Andando el tiempo pude conocer, y sentir respeto y admiración, por bastantes de aquellos protagonistas de una tarea, la investigación científica, de cuya situación deficitaria en España eran conscientes la gentes más inquietas, incluidos los profesores de enseñanza media de cuyo esfuerzo muchos somos deudores. Mi motivación por llevar adelante una carrera científica, claramente madurada a lo largo de los años de universidad, me llevó en 1970 a la Universidad de Salamanca, en búsqueda de un ambiente donde la investigación de calidad se proyectara en la enseñanza superior. El trámite administrativo que hube de completar como becario del CSIC, bajo la dirección de Julio R. Villanueva, fue realizado en el centro de Velázquez, la “casa madre” del núcleo universitario e investigador que me acogía en la muchas veces centenaria universidad salmantina.

Un organismo vivo no sólo desarrolla sus actividades vitales sino que se reproduce y evoluciona, adaptándose con frecuencia a la conquista de nuevos espacios o funciones. Valga este símil biológico para resumir una buena parte de la historia –la mejor parte- que se encierra en los muros del edificio de ladrillo que el arquitecto Fisac diseñara y construyera para el CIB. En el año 2003 seguimos inquietos por las carencias de la investigación española. Pero tan importante como señalarlas e identificar sus causas, es conocer los precedentes más recientes y valorar, en

todo lo que significan, la circunstancias en que se ha acertado o errado a la hora de decidir.

Los laboratorios, bibliotecas y salas del CTB han sido testigos del entusiasmo suscitado por los grandes avances de la biología de las últimas décadas. Con frecuencia la introducción pionera en España de nuevas metodologías se ha producido en sus laboratorios. Su biblioteca se convirtió en lugar obligado de consulta de las revistas más importantes, abasteciendo hasta hace no mucho de copias de trabajos publicados a departamentos universitarios, institutos de toda índole, en tiempos recientes. Aunque nos parezca mentira, tampoco están tan lejanos los tiempos en que no disponíamos de instantánea comunicación electrónica. Las salas del CIB han sido, en fin, lugar de presentación de cursos y conferencias, al tiempo que foros de debate sobre los logros de vanguardia de la investigación. Diversas asociaciones científicas –también lo sé por experiencia propia– han tenido en el CIB su sede administrativa y lugar de reunión para la gestión de sus actividades.

El CIB ha sido puerta de entrada a la carrera científica de muchos de los científicos que hoy ya se han establecido en España y en el mundo. Bastaría repasar la nómina de muchos de los grupos destacados de investigación biológica de este centro para percibir como en algunos momentos fue la base para el desarrollo de la enzimología más avanzada, de la biología molecular centrada en estudios de expresión y traducción del mensaje genético, de la biología del desarrollo más pionera, de la morfogénesis y otros estudios fundamentales en sistemas microbianos (virus, bacterias, eucariotas) y tantas otras temáticas. En el conjunto de los institutos que en su día integraron el CIB se desarrolló trabajo en fisiología vegetal, neurociencias, endocrinología, inmunología, biología estructural, al tiempo que planteamientos más aplicados de resolución de problemas en agricultura, medio ambiente, desarrollo farmacéutico, patología humana, etc.

Como la enumeración anterior es incompleta –por lo que pido disculpas– no cabe duda de que el CIB ha llevado adelante el trabajo más completo a favor de la promoción de la investigación biológica en España. Importante ha sido la carga soportada e importantes han sido los resultados. La destacada producción científica del CIB se magnifica al observar la fecundidad de

su labor en la promoción de otros núcleos investigadores en el CSIC y en distintas universidades. Fueron en su momento nuevos centros, surgidos del impulso del CIB, en los que materializó no sólo un estilo de investigación, sino que cristalizaron en ellos otras ideas y anhelos como la articulación de esfuerzos entre la universidad y el CSIC.

El paso del tiempo no ha disminuido la vigencia del CIB, aunque naturalmente ha exigido esfuerzos para su actualización. Volviendo a los recuerdos personales, revivo la necesidad de un nuevo edificio para este centro, convertida en demanda urgente durante muchos años, para materializar su labor científica de acuerdo con las exigencias actuales, sin perder ese poso que la aporta su tradición. Corría el año 1996 cuando tuve el honor de acceder a la presidencia del CSIC, un acontecimiento esencial en mi trayectoria profesional. Acabar con el bloqueo a que estaba sometida la construcción del nuevo Centro de Investigaciones Biológicas fue una de mis primeras iniciativas, así como una de las que asumí con mayor convicción. Desde esa responsabilidad presencié con agrado que el nuevo CIB se hacía realidad, aunque no pude verlo inaugurado durante mi mandato.

Cuando el traslado de los laboratorios de investigación al nuevo edificio es ya una realidad en marcha, siento una gran confianza en que el CIB de hoy esté a la altura del mejor CIB de otros tiempos. No son momentos fáciles para la investigación española. Igualmente cabe afirmar que la investigación biológica y biomédica se mantiene en una encrucijada permanente. El edificio que, con retraso, recibe todo el personal del CIB puede y debe ser testigo de una nueva etapa. En el océano de información que surge de la investigación actual en ciencias de la vida, hace falta identificar los territorios de avance que propicien un conocimiento nuevo. La demanda social de resultados tangibles en beneficio de la calidad de vida es una exigencia que se presenta ante los investigadores de hoy, con caracteres de mayor urgencia que en etapas pasadas. Son retos que hoy tiene delante el Centro de Investigaciones Biológicas y que sabrá afrontar si su personal los afronta con la imaginación y clarividencia de otros tiempos en un contexto nuevo.

MEMORIES OF THE CIB

CIB: THE FUTURE IN THE PRESENT

CÉSAR NOMBELA CANO

Catedrático de la Universidad Complutense

June 2003

On the fiftieth anniversary of the discovery of the double helix DNA model, we observe the leading role life sciences undeniably play in the research panorama of today's world. Life sciences comprise more than half of scientific production world-wide, enjoy the dedication of a high percentage of scientific researchers and attract the attention of public and private sector leaders who shape scientific policy in the most important countries and companies throughout the world.

New territories to be explored are being discovered, at the same time new points of enquiry are being opened up where, it is believed, in all likelihood, significant advances will be made. This is, without doubt, the reason this research area offers such a promising future. The methodological contributions of other scientific fields continue providing new possibilities to biological research. The path of the classical experimental strategies in vivo and in vitro today gives way to in silico analysis in order to process the infinite amount of data necessary to do meaningful research in "biology on a grand scale". It is essential to use this tool to transform into knowledge the information generated by genomics, proteomics and other experimental procedures –omics characteristic of today's world. In spite of everything, research continues to depend on the talent and effort of investigators capable of formulating creative hypotheses and developing intelligent experimental strategies.

These comments spring from my memories and experiences at the Centre for Biological Investigations, which has meant so much for Spanish research throughout the decades of its fruitful existence and has always adapted itself to the demands of the times. It has been a period of enormous intensity that requires a detailed analysis of what has been the role of the CIB on behalf of the best Spanish research.

During my secondary studies at the Instituto Ramiro de Maeztu, it was impossible for me not to notice the statue of a

human figure "holding up" the CIB building which today is at the point of being retired. My route of the school bus, following Pablo Aranda Street after leaving the school, daily offered me the image of the building at the corner of Joaquín Costa and Velázquez Streets. This was the end of the fifties and the beginning of the sixties. I remember that my curiosity to know what a scientific centre was doing in that part of the city stimulated my first questions about what research and researchers did. It was not infrequent to see the CIB staff walking outside the building in their laboratory coats.

As time passed I was able to get to know and feel respect and admiration for quite a few of the leading actors in an undertaking, scientific research, that had a deficient situation in Spain. The most forward-thinking people were aware of this situation, and this group included the professors of secondary education to whose efforts we owe so much. My motivation to make a career in science, which had clearly taken shape during my university years, took me to the University of Salamanca in 1970 in search of an atmosphere where quality investigation formed part of higher studies. The administrative formalities that I had to complete as an intern of the CSIC, under the direction of Julio R. Villanueva, were done at the centre on Velázquez Street, the "mother house" of the university research group that was to welcome me at the many times centenary university.

A living organism does not develop its vital activities without reproducing and evolving, adapting itself frequently to conquer new spaces and functions. This biological metaphor summarises a good part of the history – the best part – that is contained within the walls of the brick building designed and built by the architect Fisac for the CIB. In the year 2003 we continue to be troubled by the needs of Spanish research. But, just as important as pointing out and identifying their causes is understanding the most recent precedents and judging, from every angle, the circumstances in which decision-making has been correct and those in which it has erred.

CIB laboratories, libraries and lecture halls have been witnesses to the enthusiasm provoked by the great advances in biology of the last decades. Frequently, the pioneering introduction in Spain of new methodologies has occurred inside its laboratories. Its library turned into an obligatory reference point to consult the most important journals, providing, until very recently, copies of published work to university departments and institutes of all kinds. Although it seems hard to believe, the time when we did not have instant electronic communication at our disposal was not so long ago. The lecture halls of the CIB have ultimately been a place to present courses and lectures as well as a forum for debate on the advances in the vanguard of research. Different scientific associations – I know this from my own experience – have had in the CIB their administrative headquarters and a meeting place to manage their activities.

The CIB has been a port of entry to science careers for many scientists who have established themselves in Spain or in other parts of the world. It would be enough to review the accomplishments of many of the outstanding, biological research groups of the centre to see how at some given moment it was the basis for the development of the most advanced enzymology, of molecular biology centred in the expression and translation of the genetic code, of the development of the most pioneering biology, of morphogenesis and other fundamental studies in microbial systems (virus, bacteria, eucariots) and many other fields. Within the group of institutes which, at one time or another, made up the CIB, work was carried out on plant physiology, neurosciences, endocrinology, immunology, structural biology, at the same time as very practical solutions to problems in agriculture, the environment, pharmaceutical research, human pathology, etc. were investigated.

As the previous listing is incomplete – for which I apologise – there is no doubt that the CIB has advanced a very complete labour on behalf of fomenting biological research in Spain. The burden has been great but so have the results. The impressive scientific production of the CIB is magnified when we observe the fruitfulness of its work in the promotion of other groups of researchers in the CSIC and in various universities. At one time they were new centres, arising from the impetus of the CIB, where not only a style of investigation materialised, but also

other ideas and aspirations crystallised, joint efforts between the university and the CSIC being an example.

The passing of time has not diminished the relevance of the CIB, although naturally efforts were necessary to keep it up-to-date. Returning to personal recollections, I am reminded how the need for a new building for this centre became, for many years, an urgent demand in order to carry out scientific work in accord with the present-day requirements without losing the foundation that tradition had laid. In the year 1996, I had the honour of taking over the presidency of the CSIC, a crucial moment in my professional life. To remove the blockage to which the construction of the new Centre for Biological Investigations was subjected was one of my first initiatives and was one of the ones I took up with the greatest conviction. From that position I happily witnessed how the new CIB became a reality, even though I was not able to see it inaugurated during my term in office.

With the transfer of the research laboratories to the new building a current reality, I have great confidence that the CIB of today is equal to the best CIB of other times. These are not easy times for Spanish research. Of course, it is useful to point out that biological and biomedical research are always at a permanent crossroads. The building that, with delay, receives all the staff of the CIB can and should be witness to a new stage in its development. In the ocean of information that arises from present research in life sciences, we should identify the areas of progress that lead to new knowledge. Society's demand for tangible results that improve our quality of life is a requirement that is made of today's researchers with even more urgency than in past times. These are challenges that the Centre for Biological Investigations has taken up and will know how to confront in a new context if its staff confronts them the imagination and far-sightedness of other times.

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo

Department of Cell and Developmental Biology

Jefe de Departamento
Department Head

ENRIQUE DE LA ROSA CANO (Desde I-2002)
JESÚS DEL MAZO MARTÍNEZ (Hasta XII-2001)

Profesores de Investigación

CONSUERO DEL TORRE GARCÍA-QUINTANA

Investigadores Científicos

PATRICIO ALLER TRESGUERRES
FLORA DE PABLO DÁVILA
ENRIQUE DE LA ROSA CANO
JOSÉ LUIS DIEZ CORTÉS
PEDRO ESPONDA FERNÁNDEZ
LUCAS SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JORGE BERNARDO SCHWARTZMAN BLINDER

Científicos Titulares

JESÚS DEL MAZO MARTÍNEZ
CLARA GODAY BAYLINA
BEGONA GRANADINO GOENECHEA
PABLO HERNÁNDEZ VLAENZUELA
DORA B. KRIMER SMUNIS
JAVIER REY CAMPOS
MIGUEL ÁNGEL VIDAL CABALLERO

Personal Técnico

ISABEL ÁLVAREZ
ROSARIO DE ANDRÉS MONTES
ELENA DE BLAS BROTONS
MARGARITA CARRASCOSA CEBRIÁN
MARÍA JOSEFA FERNÁNDEZ-CABRERA BAZÁN
ASCENSION GONZÁLEZ DÍAZ
CRISTINA IGLESIAS GUIASOLA
JOSÉ LUIS MARCILLA CABANILLAS
M^º LUISA MARTÍNEZ ROBLES
DOLORES MATEOS MOYA
AMELIA PARTEARROYO LACABA
M^º PILAR ROBLES GONZÁLEZ

Secretaría

CARMEN PARTEARROYO LACABA

Biología Molecular de los Cromosomas

Molecular Biology of Chromosomes

JORGE BERNARDO SCHVARTZMAN BLINDER

Jefe de Grupo / Group Leader

PABLO HERNÁNDEZ VALENZUELA

DORA BEATRIZ KRIMER SMUNIS

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

ALBERTO BENGURÍA FILIPPINI (Hasta VI-2002)

ROSA RODRÍGUEZ PÉREZ (Desde VI-2002)

Investigadores Contratados / Research Associates

MARÍA JOSÉ FERNÁNDEZ NESTOSA

ANA GARCÍA SACRISTÁN

EVA MARÍA MEJÍA RAMÍREZ DE ARELLANO (Desde IX-2002)

LETICIA OLAVARRIETA SCAPPINI

ALICIA SÁNCHEZ GOROSTIAGA (Hasta IX-2002)

LEONOR RODRÍGUEZ SÁNCHEZ (Desde II-2002)

RAÚL TORRES TORRES

B. Predoctorales / Graduate Students

TATIANA IVANENKO (II-V, 2001)

Investigadora Visitante / Visiting Scientist



M^a LUISA MARTÍNEZ ROBLES

M^a PILAR ROBLES GONZÁLEZ

Personal Técnico / Technicians

Estudio de los cambios topológicos que experimenta el DNA durante la replicación

Palabras clave: Replicación, Barreras, Superenrollamiento, Encadenados, Nudos

A lo largo de estos dos últimos años hemos estudiado los cambios topológicos que experimenta el DNA a medida que transcurre la replicación utilizando como modelo experimental plásmidos de *Escherichia coli*. La construcción de plásmidos con un origen de replicación ColEI y una barrera polar para el progreso de las horquillas nos ha permitido comprobar, mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa y microscopio

Changes in Topology During DNA Replication

Keywords: *Replication, Barriers, Supercoiling, Catenanes, Knots*

Throughout 2001-2002 we investigated how DNA topology changes as replication proceeds. We used Escherichia coli plasmids as a model system. Several plasmids were constructed bearing a unidirectional ColEI origin and a polar replication fork barrier located at different distances from the origin. Two-dimensional agarose gel electrophoresis and electron microscopy were used to show that negative supercoiling progressively diminishes as the replication fork advances. We found also

pía electrónica de intermediarios de replicación intactos, que el grado de superenrollamiento negativo disminuye a medida que progresa la replicación. También hemos comprobado que las drogas cloroquina y bromuro de etidio, que inducen el superenrollamiento positivo de las formas no replicativas, son incapaces de superenrollar positivamente los plásmidos parcialmente replicados. Esto se debe a que en los intermediarios de replicación el superenrollamiento positivo es inmediatamente adsorbido por un retroceso de las horquillas con la consiguiente formación de estructuras de tipo Holliday (Olavarrieta et al., 2002a)

La acumulación de intermediarios específicos con la horquilla detenida a distintas distancias del origen nos ha permitido estudiar la dinámica de la formación de intermediarios de repli-

that Chloroquine and Ethidium Bromide, two drugs that are known to induce positive supercoiling of non-replicating molecules, are unable to introduce positive supercoiling in partially replicated plasmids. This occurs because in those plasmids containing a replication fork positive supercoiling is immediately adsorbed by a regression of the replication fork with the concomitant formation of a Holliday-like junction (Olavarrieta et al., 2002a)

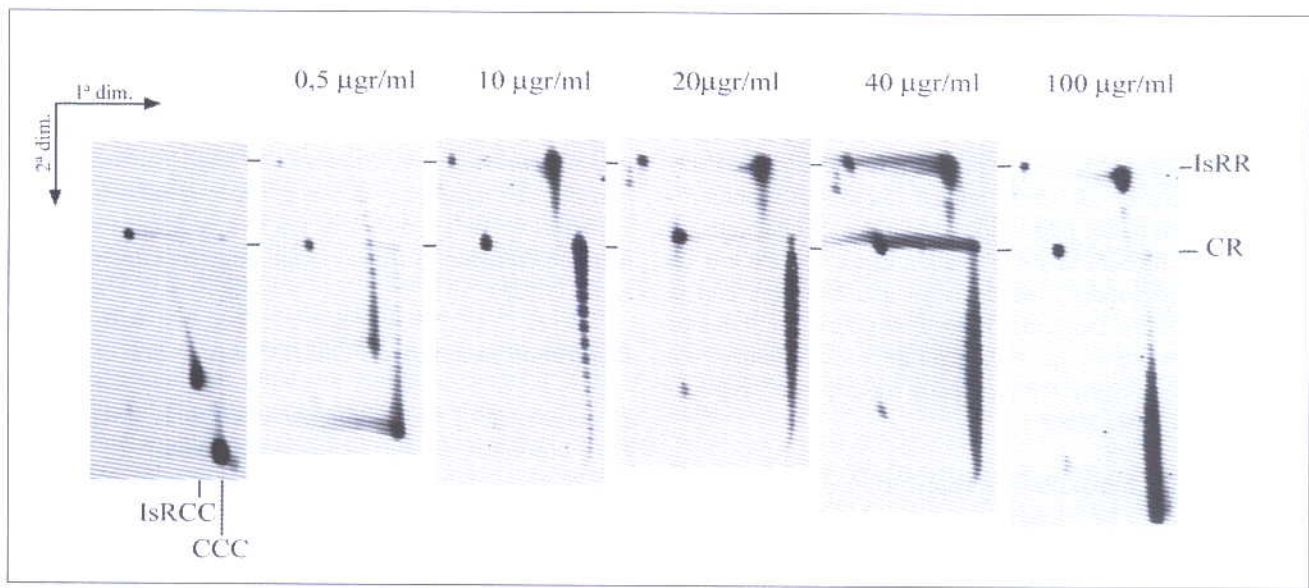


Figura 1: La cloroquina es incapaz de inducir el superenrollamiento positivo de plásmidos parcialmente replicados. Análisis de pBR18-TerE@StyI por electroforesis bidimensional en geles de agarosa en donde la segunda dimensión ocurrió en ausencia (a la izquierda) o en presencia de concentraciones crecientes de cloroquina. CCC = Círculos Covalentemente Cerrados de formas no replicativas, CR = Círculos Relajados de formas no replicativas, IsRCC = Intermediarios de Replicación (1,26x) Covalentemente Cerrados, IsRR = Intermediarios de Replicación (1,26x) Relajados (Olavarrieta et al. 2002a)

Figure 1: Chloroquine is unable to induce positive supercoiling of partially replicated plasmids. Analysis of intact forms of pBR18-TerE@StyI by two-dimensional agarose gel electrophoresis where the second dimension occurred without (to the left) or in the presence of different concentrations of Chloroquine. CCC = Non-replicative covalently closed circles, CR = Non-replicative open circles, IsRCC = Covalently closed replication intermediates (1.26x), IsRR = Open circle replication intermediates (1.26x) (Olavarrieta et al. 2002a)

cación anudados. Las burbujas anudadas involucran a las dos doble-hélices hermanas detrás de la horquilla. Se forman normalmente sin necesidad de detener la horquilla, aunque el bloqueo de la misma y la eliminación del superenrollamiento mediante digestión con enzimas que cortan en la región no replicada facilitan su detección por electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Hemos comprobado que el número y complejidad de estas burbujas anudadas aumenta en función del tamaño de la burbuja. Estas observaciones sugieren que la probabilidad de formación de nudos aumenta a medida que disminuye la densidad de pre-encadenados. Dado que el superenrollamiento negativo disminuye a medida que progresa la replicación, el número de pre-encadenados se reduce y aumenta la probabilidad de anudamiento (Olavarrieta et al., 2002b) También hemos estudiado el efecto de la colisión frontal entre transcripción y replicación sobre la formación de burbujas anudadas. Hemos comprobado que este tipo de colisión aumenta significativamente tanto el número como la complejidad de los nudos. Esta observación sugiere que el superenrollamiento positivo que se acumula entre las horquillas de transcripción y replicación a medida que éstas avanzan en direcciones opuestas, reduce aún más el superenrollamiento negativo de los plásmidos parcialmente replicados, lo que aumenta la probabilidad de anudamiento. Un exceso de nudos tiene consecuencias deletéreas ya que interfiere con la segregación de las dos moléculas hijas. Esta podría ser al menos una de las razones por las que en la naturaleza los genomas evolucionan evitando la colisión frontal entre transcripción y replicación (Olavarrieta et al., 2002c)

Barreras para las horquillas de replicación e inestabilidad del DNA

Palabras clave: Replicación del DNA, Bloqueo de horquillas, DNA ribosómico, Inestabilidad del DNA, Expansión de tripletes repetidos

El desplazamiento del complejo de replicación a lo largo del DNA no es homogéneo, sino que, frecuentemente, encuentra obstáculos que constituyen barreras o paradas temporales para las horquillas de replicación. Estas barreras pueden ser producidas por lesiones presentes en el DNA, estructuras secundarias inusuales o proteínas unidas al DNA. Existen varias evidencias de que en muchos casos, una horquilla de replicación bloqueada

Analysis of specific intermediates with the replication fork stalled at different distances from the origin allowed us to understand the dynamics of knotting during DNA replication. Knotting of the two daughter duplexes behind the fork (knotted bubbles) can take place during unconstrained replication. In plasmids containing a stalled fork, however, linearization with a restriction enzyme that cuts outside the replicated portion greatly facilitates detection of these knotted bubbles in 2D gels. We found that the number and complexity of knotted bubbles increase as a function of bubble size. This observation indicates that the probability for knotting increases as the number of precatenanes diminishes (Olavarrieta et al., 2002b) We studied also the effects of head-on collision of transcription and replication on DNA knotting. This type of collision increases the number and complexity of replication knots. This observation suggests that the positive supercoiling that accumulates between transcription and replication forks as they advance against each other, once it migrates behind the fork, reduces the number of precatenanes increasing the probability for knotting. As replication is completed, all remaining precatenanes and knots become true catenanes. For this reason any excess of knots would seriously hamper segregation. We propose this might explain why nature avoids head-on collision of transcription and replication (Olavarrieta et al., 2002c)

Replication fork barriers and DNA instability

Keywords: DNA replication, Arrested forks, Ribosomal DNA, DNA instability, Expansion of triplet repeats

Movement of the replication complex along the DNA is not uniform. Frequently, the replisome encounters obstacles that function as replication barriers producing pausing or blockage of the replication fork. DNA lesions, unusual DNA structures and proteins bound to the DNA are among the potential causes of replication fork arrest. Several research lines indicate that arrested or collapsed replication forks trigger DNA damage checkpoints and are the substrate for DNA repair machinery to rescue collapsed forks. Recombinational repair plays a relevant role in the reactivation of arrested forks. We study two of these DNA replication barriers: the natural barriers present in the eukaryotic rDNA, named RFBs, and the replication arrest induced by trinucleotide tandem repeats. The expansion of trinucle-

o colapsada constituye una verdadera lesión en el DNA ante la que la célula responde activando puntos de chequeo y procesos de reparación orientados a la reactivación de la horquilla, entre los que la reparación por recombinación homóloga juega un papel relevante. Estamos estudiando dos tipos de estas barreras para la replicación del DNA: las barreras naturales presentes en el rDNA de organismos eucarióticos, denominadas RFBs, y aquellas inducidas por repeticiones trinucleotídicas, cuya expansión constituye la mutación responsable de una serie de enfermedades hereditarias humanas. Hemos comprobado que en *Saccharomyces cerevisiae*, las horquillas bloqueadas son potencialmente recombinogénicas. En mutantes *sir2*, plásmidos que llevan estas barreras activas se integran rápidamente en el rDNA cromosómico, probablemente por un mecanismo de recombinación homóloga (Benguría et al., 2003), sugiriendo que la proteína silenciadora y desacetilasa de histonas Sir2 modula el acceso de la maquinaria de recombinación a las horquillas bloqueadas. En el rDNA de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, hemos identificado tres barreras naturales que bloquean la replicación de una manera polar. Dos de estas RFBs se producen por la unión del factor terminador de la transcripción del rRNA *reb1p* a sus dos secuencias de unión localizadas cerca del extremo 3' del gen 25S, mientras que la tercera RFB es independiente de *reb1p*. Esta es la primera demostración *in vivo* de un factor de terminación de transcripción que también bloquea la maquinaria replicativa que se mueve en dirección contraria, sugiriendo que una de sus funciones podría ser impedir la colisión frontal de ambas maquinarias en el *locus* rDNA.

La estructura secundaria adoptada por algunas secuencias de DNA pueden ocasionar el bloqueo de la replicación, sin la intervención aparente de factores asociados. Este parece ser el caso de la parada de la replicación inducida por microsatélites trinucleotídicos, cuya expansión constituye la mutación responsable de un elevado número de enfermedades hereditarias humanas. Hemos comprobado que el trinucleótido repetido GAA•TTC, cuya expansión es la causa de la ataxia de Friedreich, induce la parada del complejo de replicación de forma polar, siendo esto una de las causas de su inestabilidad. Nuestros resultados indican que existe un factor adicional que también contribuye a esta inestabilidad y que está relacionado con la estructura en DNA tríplex que este microsatélite adopta.

otide repeats is the mutation responsible for a series of hereditary human diseases. In Saccharomyces cerevisiae, we found that forks blocked at the rDNA RFBs are potentially recombinogenic. In sir2 mutant strains, RFB-bearing plasmids integrate into the chromosomal rDNA, probably by homologous recombination (Benguría et al., 2003), suggesting that the histone deacetylase silencing protein Sir2 modulates access of the recombination machinery to the forks stalled at the rDNA RFBs. In the fission yeast Schizosaccharomyces pombe rDNA, we identified three natural RFBs that arrest replication in a polar manner. Two of these RFBs require both the transcription termination factor reb1p and its two binding sites near the 3' end of the 25S gene, whereas the other RFB function in the absence of these cis- and trans-acting factors. This is the first description of an in vivo transcription termination factor that also arrests the replication machinery approaching in the opposite direction, suggesting that its function could be to prevent head-on collision between replication and transcription within the rDNA locus.

Secondary structure of some DNA sequences can also induce replication arrest per se without the requirement of additional factors. This seems to be the case for trinucleotide tandem repeats expanded in a series of hereditary human diseases. We have found that the repeated trinucleotide GAA•TTC, that is expanded in Friedreich ataxia, induces fork arrest in a polar fashion. This fork pausing is one of the causes of the unstable behavior of this repeated triplet. An additional factor related to the capacity of this trinucleotide to form triplex DNA, also contributes to this instability.

Regulation of HMBA-induced Differentiation in Murine Erythroleukemia Cells

Keywords: Erythroleukemia, Cell differentiation, Gene expression, cDNA libraries, clk/STY

Tumor cells are characterized by a loss of control of cell proliferation and blockage of cell differentiation. In many instances, however, cells are able to reinitiate and successfully complete the differentiation program, including reestablishment of terminal cell division. One of the main goals of our group is to understand how oncogenic transformation interferes with mechanisms of regulation and how the normal process can be

Regulación de la diferenciación inducida con HMBA en células eritroleucémicas

Palabras clave: Eritroleucemia, Diferenciación celular, Expresión génica, Librerías de cDNA, clk/STY

Las enfermedades tumorales involucran una pérdida del control de la proliferación y un bloqueo de la diferenciación celular. Existen evidencias que indican que bajo condiciones apropiadas, las células tumorales son capaces de reiniciar y completar su programa de diferenciación, incluyendo el camino hacia la división celular terminal. Desde hace ya varios años, uno de los objetivos de nuestro grupo es avanzar en el conocimiento de cómo la transformación oncogénica interfiere con los mecanismos de regulación en células tumorales y cómo estas perturbaciones pueden ser revertidas para reestablecer los controles normales. Nuestro planteamiento se basa en el estudio de las bases moleculares del bloqueo de la diferenciación en células de la eritroleucemia murina (MEL) y de los cambios que tienen lugar cuando estas células son inducidas a una diferenciación terminal. Las células MEL, bloqueadas a nivel de proeritroblastos por integración del complejo vírico Friend, pueden ser inducidas a reiniciar el programa de diferenciación mediante agentes como el HMBA. Uno de nuestros objetivos es la identificación de genes cuya activación (o represión) tenga lugar durante las primeras etapas de la determinación celular. El empleo de técnicas de hibridación diferencial y librerías de sustracción nos ha permitido identificar genes cuya expresión es modulada a lo largo de la diferenciación inducida de células MEL (Vanegas et al, 2003) En colaboración con el grupo del Dr J. del Mazo hemos ampliado este estudio a etapas tempranas del desarrollo del ratón (López-Casas, 2002, 2003)

Actualmente nuestro interés se centra en dos proyectos concretos:

a) Regulación de la proteína quinasa clk/STY a lo largo de la diferenciación. Clk/STY es una proteína quinasa de doble acción, capaz de fosforilar residuos de serina/treonina así como de tirosina, que interactúa preferencialmente con las proteínas de la familia SR. Hemos comprobado que clk se activa a lo largo de la diferenciación inducida de células MEL y que la expresión exógena de clk acelera la aparición de células diferenciadas. Utilizando vectores de expresión inducibles por tetraciclina,

reconstituted. Our studies are based on the molecular analysis of blockage of differentiation in murine erythroleukemia (MEL) cells.

MEL cells blocked at the proerithroblast stage by the integration of the Friend complex virus, can be induced to reenter their terminal differentiation program by the action of several agents such as HMBA. We want to identify genes that are activated or repressed during the early steps of cell commitment. Our working hypothesis is that a temporal sequence of changes in expression of certain genes is an essential part of switching tumor cells back into terminal differentiation. Using differential hybridization and subtracted libraries we identified genes whose expression is modulated throughout MEL induced differentiation (Vanegas et al, 2003) In collaboration with Dr J. del Mazo we also studied expression of these genes during mouse development (López-Casas et al, 2002, 2003)

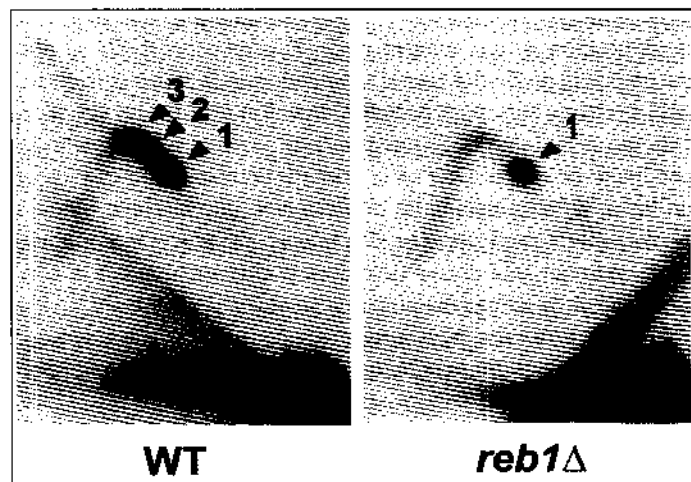


Figura 2: Electroforesis bidimensional en geles de agarosa mostrando que el bloqueo de la replicación en dos de las tres barreras presentes en el rDNA de *S. pombe* requiere del factor terminador de la transcripción reb1p.

Figure 2: Two-dimensional agarose gel electrophoresis showing that fork blockage at two out of three replication fork barriers in *S. pombe* rDNA, requires the transcription termination factor reb1p.

estamos analizando en qué momento del proceso actúa *clk* y cuáles son los efectos de un bloqueo en distintos momentos de la diferenciación. Asimismo, estamos llevando a cabo estudios similares con otros miembros de la familia *clk* (*clk2*, 3 y 4)

b) Aislamiento de genes que se expresan diferencialmente en líneas MEL resistentes al HMBA. Hemos establecido líneas celulares resistentes que no se diferencian en presencia de HMBA. El empleo de técnicas RDA (*Representational Differential Analysis*) nos ha permitido aislar genes que sólo se expresan en estas líneas resistentes. Actualmente estamos trabajando en la caracterización de algunos de estos genes.

We are currently working in two main projects:

a) *Regulation of protein kinase clk/STY throughout differentiation. Clk/STY is a dual protein kinase that phosphorylate serine/threonine or tyrosine residues and interacts with SR proteins. We showed that clk is up regulated during MEL differentiation and that exogenous clk expression accelerates the appearance of committed cells. We are using tetracyclin inducible expression vectors to study the effects of clk during different stages of MEL differentiation. We are also studying other members of the clk/STY family (clk2, 3 and 4)*

b) *Identification of differentially expressed genes in HMBA-resistant MEL cells. We have established MEL cell lines resistant to HMBA that have lost the capacity to differentiate. We used RDA to identify and isolate genes that are differentially expressed in this cell line. Characterization of some of these genes is currently underway.*

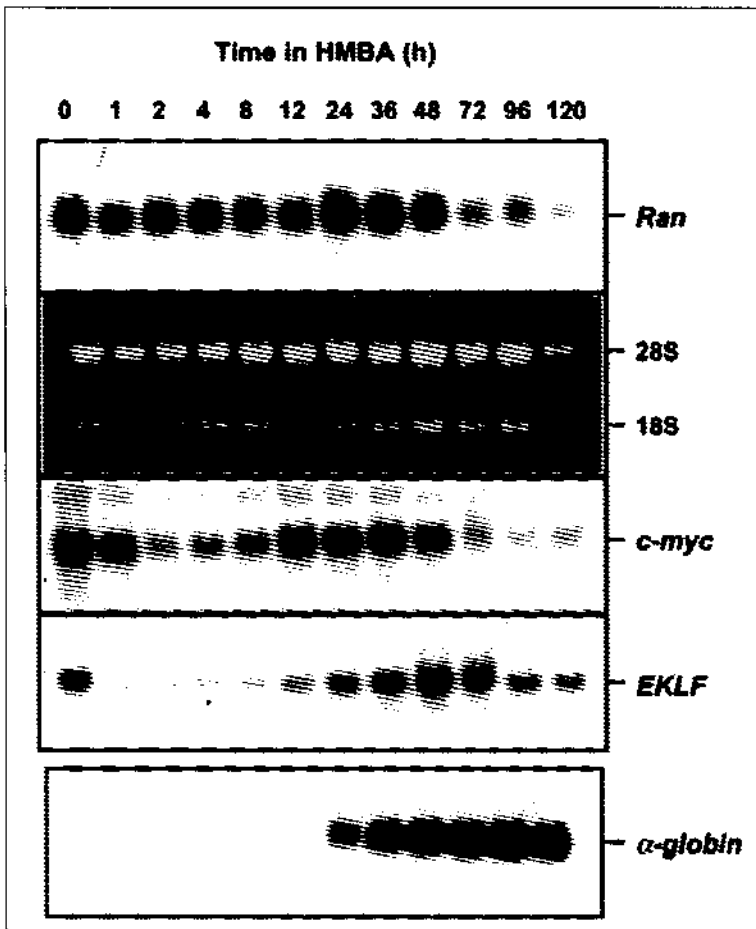


Figura 3: Expresión de Ran, c-myc, EKLF y α -globina a lo largo de la diferenciación inducida con HMBA de células MEL.

Figure 3: Expression of Ran, c-myc, EKLF and α -globin throughout HMBA-induced cell differentiation in MEL cells.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PM97-0138 (1998-2001)
- FIS, 99/0850 (1999-2001)
- DGICYT, PB98-0484 (2000-2002)
- CAM, 08.5/0057.1 (2002-2003)
- CAM, 08.1/0067.1 (2002-2003)
- DGICYT, SAF2001-1740 (2002-2004)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Baranska, S., Gabig, M., Wegrzyn, A., Konopa, G., Herman-Antosiewicz, A., Hernandez, P., Schwartzman, J.B., Helinski, D.R., and Wegrzyn, G. (2001) Regulation of the switch from early to late bacteriophage lambda DNA replication. *Microbiology* 147, 535-547.
- López-Casas, P.P., López-Fernández, L.A., Krimer, D.B., and Del Mazo, J. (2002) Ran GTPase expression during early development of the mouse embryo. *Mech. Dev.* 113: 103-106.
- Olavarrieta, L., Martínez-Robles, M.L., Sogo, J.M., Stasiak, A., Hernández, P., Krimer D.B., and Schwartzman, J.B. (2002a) Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. *Nucleic Acids Res* 30, 656-666.
- Olavarrieta, L., Martínez-Robles, M.L., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2002b) Knotting dynamics during DNA replication. *Mol. Microbiol.* 46, 699-707.
- Olavarrieta, L., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman J.B. (2002c) DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J. Mol. Biol.* 322: 1-6.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Benguría, A., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2003) Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* (en prensa/in press)
 - López-Casas P.P., López-Fernández, L.A., Párraga, M., Krimer, D.B., and Del Mazo, J. (2003) Expression pattern of Ran-GTPase in mouse testis. Developmental regulation of expression for Ran/M1 and Ran/M2 isoforms. *Intl J Develop Biol* (en prensa/in press)
 - Vanegas, N., García-Sacristán, A., López-Fernández, L.A., Párraga, M., Del Mazo, J., Hernández, P., Schwartzman, J.B., and Krimer, D.B. (2003) Differential expression of Ran GTPase during HMBA-induced differentiation in murine erythroleukemia cells. *Leukemia Res* (en prensa/in press)
-

Reproducción Celular

Cell Reproduction

CONSUELO DE LA TORRE GARCÍA-QUINTANA
Jefa de Grupo / Group Leader
Investigadora de Carrera / Staff Scientist

GONZALO GIMÉNEZ MARTÍN
Investigador Emérito / Emeritus Scientist

JUAN FRANCISCO GIMÉNEZ ABIÁN
Investigador Contratado Programa Ramón y Cajal /
Tenure Scientist Ramón y Cajal Program (Desde XII-2002)

SUSANA PÉREZ TALAVERA (III-2001 a IV-2002, sabático)
JUANA PINCHEIRA VEGA (II y XI-2001, I-2002)
Investigadoras Visitantes / Visiting Scientists

JESÚS ÁNGEL CARBALLO GONZÁLEZ-CORROTO
B. Predoctoral / Graduate Student

MARGARITA CARRASCOSA CEBRIÁN
JOSÉ LUIS MARCILLA CABANILLAS
Personal técnico / Technicians

Palabras clave: Ciclo celular, Rutas de chequeo, Ciclinas mitóticas, Daño y reparación del DNA, Estructura cromosómica

Keywords: Cell cycle, Checkpoint pathways, Mitotic cyclins, DNA damage and repair, Chromosome structure

Regulación negativa del ciclo celular: rutas de chequeo

Cell cycle regulation by checkpoint pathways

Las rutas de chequeo frenan la entrada irreversible en una etapa subsiguiente del ciclo celular cuando una célula no se encuentra aún debidamente preparada. Para activar rutas chequeo de daño en el DNA en G2 y mitosis se ha usado radiación ionizante e inhibidores de topoisomerasa II, la enzima que resuelve catenaciones que se producen en el DNA. Para activar rutas de chequeo de replicación se usó hidroxiurea, el inhibidor de la ribonucleótido reductasa.

La cafeína y el ácido okadaico cancelaron las rutas de daño en el DNA durante G2 y mitosis, pero sólo fueron capaces de cancelar el chequeo de replicación cuando se inducía la expresión ectópica del gen que codifica por una de las ciclinas mitó-

This group deals with the negative or feedback regulation of cycle progression by checkpoint pathways. These are able to delay irreversible transitions between two subsequent cycle phases until some requirements are fulfilled by the cell. To activate checkpoint pathways surveying DNA damage in G2 and mitosis, ionizing radiation and topoisomerase II inhibitors preventing the resolution of DNA catenation were used. Replication checkpoints were activated by hydroxyurea, an inhibitor of the ribonucleotide reductase.

The work done shows that caffeine and okadaic acid cancelled out the DNA damage checkpoint during G2 and mitosis. Cancellation of replication checkpoints additionally required

ticas de plantas, la B2. El complejo CDK• ciclina B2, en plantas, se mostró como factor limitante para la entrada en mitosis y una de las dianas de las señales antimitogénicas producidas por rutas de chequeo. La ciclina mitótica B2 de plantas aparece funcionalmente semejante a la ciclina A de animales. La ciclina B2 endógena es siempre nuclear, está presente en el ciclo sólo entre el tardío G2 y la profase media, y su proteolisis es independiente del proteosoma o APC (*Anaphase Promoting Complex*). Por el contrario, las ciclina B1, las otras ciclinas mitóticas de plantas, alcanzan su máxima acumulación antes de iniciarse la anafase, donde son degradadas por el proteosoma.

Se ha definido, asimismo, la existencia de una secuencia de transiciones irreversibles controladas por rutas de chequeo que se activan al inhibir la topoisomerasa II. Una de ellas, en G2, controla la individualización de los distintos cromosomas, consecuencia de la resolución de catenaciones no replicativas.

La segunda transición corresponde al paso de la fase reversible a la irreversible del ciclo de condensación cromosómica, en la profase media. La tercera, controla la rotura de la envoltura nuclear en la transición profase a prometafase. Actualmente estamos investigando si la remoción de catenaciones replicativas que permite la resolución de cromátidas hermanas a lo largo de los brazos cromosómicos controla la transición profase temprana a profase tardía o la existente entre profase y prometafase.

Una cuarta transición irreversible se produce en el paso metafase a anafase, que sólo se licencia cuando se resuelven las catenaciones replicativas residuales en zonas centroméricas. Este control está integrado en la llamada ruta de chequeo del huso mitótico. La superación o la cancelación del chequeo del huso lleva a la proteolisis de la proteína securina, permitiendo así la activación de la separasa, que ocurre sin necesidad de su rotura. La separasa libera los complejos de cohesinas que mantienen unidas a las cromátidas hermanas por las regiones centroméricas, haciendo así posible la segregación de cromátidas hermanas en anafase.

Se ha abordado el papel que juegan en las rutas de chequeo de daño en el DNA en G2 moléculas como la quinasa ATM, la nibrina y complejos moleculares en lo que participan proteínas FANC, estudiando la respuesta de células de pacientes con ataxia telangiectasia, síndrome de Nijmegen y anemia de Fanconi a radiación ionizante.

the ectopic expression of a gene that codifies for one of the plant mitotic cyclins, the B2. This is functionally analogous to cyclin A from mammalian cells. The endogenous plant cyclin B2 is always nuclear and is only present between late G2 and mid prophase. Cyclin B2 proteolysis is APC or proteasome-independent. On the other hand, the B1 plant mitotic cyclins reach their maximum accumulation before the onset of anaphase, when they are proteasome-degraded.

A series of irreversible transitions were found to be linked to previous DNA topoisomerase II-dependent decatenations. One of them, in G2, controls the individualization of different chromosomes mediated by the resolution of non-replicative random catenations.

A second one corresponds to the reversible-to-irreversible phases of the chromosomal condensation cycle in midprophase. The third one controls nuclear envelope breakdown at the prophase to prometaphase transition. We are at present trying to discern whether the resolution of sister chromatids throughout chromosomal arms control either the early to late prophase transition, or the prophase to prometaphase one.

A fourth irreversible transition is the metaphase to anaphase one. This is only licensed when the residual replicative catenations in the centromere are solved. This control is integrated in the mitotic spindle checkpoint. Recovery or override of such a checkpoint induces the proteolysis of the securin protein. This in turn activates the breakage-independent separase, that releases the cohesin complexes that still maintain the sister chromatids bound by their centromeres, making their segregation possible.

This group has also dealt with the role that the ATM kinase, the nibrin protein and FANC, containing molecular complexes play in the checkpoint pathways involved in the surveillance of DNA damage in G2. For this, the responses of cells from patients with ataxia telangiectasia, Nijmegen syndrome and Fanconi's anemia were also studied.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, BOCM 4323/2000 (2000-2001)
- CAM, BOCM 28/1/2000 (2000-2002)
- MECyD, SAB1999-0127 (2001-2002)
- DGI MCyT, BMC2001-2195 (2002-2004)
- Programa Ramón y Cajal, MCyT (2002-2006)

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

- Acevedo, R., Moreno Díaz de la Espina, S., Fernández-Gómez, M.E., Cuadrado, A., Jouve, N., and De la Torre, C. (2001) Dormancy and onset of proliferation in three *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids differing in the number of the introgressed *S. spontaneum* chromosomes. *J. Exp. Botany* 52, 1203-1208.
- Giménez-Abián, J.F., Clarke, D.J., Giménez-Abián, M.I., De la Torre, C., and Giménez-Martín, G. (2001) Synchronous nuclear envelope breakdown and anaphase onset in plant multinucleate cells. *Protoplasma* 218, 192-202.
- Pelayo, H.R., Lastres, P., and De la Torre, C. (2001) Replication and G2 checkpoints: their response to caffeine. *Planta* 212, 444-453.
- Pincheira, J., Bravo, M., Navarrete, M.H., Marcelain, K., López-Sáez, J.F., and De la Torre, C. (2001) Ataxia telangiectasia: G2 checkpoint and chromosomal damage in proliferating lymphocytes. *Mutagenesis* 16, 419-422.
- Pincheira, J., Bravo, M., Santos, M.J., De la Torre, C., and López-Sáez, J.F. (2001) Fanconi anemia lymphocytes: effect of DL-alpha tocopherol (Vitamin E) on chromatid breaks and on G2 repair efficiency. *Mutation Res.-DNA repair* 461, 265-271.
- Acevedo, R., Cuadrado, A., De la Torre, C., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2002) Behaviour of ribosomal genes and nucleolar domains during activation of root primordia in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) From unsoaked quiescence to the steady state of proliferation. *Eur. J. Histochem.* 46, 143-148.
- Clarke, D.J., Smith, A.P.L., and Giménez-Abián, J.F. (2001) DNA-damage-independent checkpoints from yeast to man. En: *Cell Cycle Checkpoints and Cancer* (M. Blagosklonny edit.) Landes Bioscience pg. 78-115.
- Giménez-Abián, J.F., Clarke, D.J., Giménez-Martín, G., Weingartner, M., Giménez-Abián, M.I., Carballo, J.A., Moreno Díaz de la Espina, S., Bögre, L., and De la Torre, C. (2002) DNA catenations that link sister chromatids until the onset of anaphase are maintained by a checkpoint mechanism. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 9-16. (Con portada de la revista)
- Giménez-Abián, J.F., Weingartner, M., Binarova, P., Clarke, D.J., Anthony, R.G., Calderini, O., Heberle-Bors, E., Moreno Díaz de la Espina, S., Bögre, L., and De la Torre, C. (2002) A topoisomerase II-dependent checkpoint in G2-phase plant cells can be bypassed by ectopic expression of mitotic Cyclin B2. *Cell Cycle* 1, 187-192. Con comentario editorial "Decatenation checkpoint is conserved across the two metazoan kingdoms", por Dr. L. Kauffman.
- López-Sánchez, J., Murciano, A., Lahoz-Beltrá, R.J., Zamora, J., Giménez-Abián, M.I., López-Sáez, J.F., De la Torre, C., and Cánovas, J.L. (2002) Modelling complex populations formed by proliferating, quiescent and quasi-quiescent cells: application to plant root meristems. *J. Theor. Biol.* 215, 201-213.

- Samaniego, R., De la Torre, C., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2002) Dynamics of replication foci and nuclear matrix during S phase in *Allium cepa* L. cells. *Planta* 215, 195-204.
- Smith, A.P.L., Giménez-Abián, J.F., and Clarke, D.J. (2002) DNA-damage-independent checkpoints: yeast and higher eukaryotes. *Cell Cycle* 1, 16-33
- Waizenegger, I.C., Giménez-Abián, J.F., Wernic, D., and Peters, J.-M. (2002) Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr. Biol.* 12, 1368-1378. (Con la portada de la revista y 5 figuras adicionales como material suplementario on line). Destacado por la revista como "featured article" del número.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Pérez-Talavera, S., Carballo, J.A., and De la Torre, C. (2003) Lack of mitotic delays at the onset of proliferation in dormant root primordia challenged by ionizing radiation. *Biol. Plantarum* 46.
 - De la Torre, C., Pincheira, J., and López-Sáez, J.F. (2003) Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks (A review) *Histol. Histopathol.* 18, 225-243.
 - Weingartner, M., Pelayo, H.R., Binarova, P., Zwerger, K., Melikant, B., De la Torre, C., Heberle-Bors, E., and Bögre, L. (2003) A plant Cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J. Cell Sci.* 126, 487-498.
 - Moreno Díaz de la Espina S., and De La Torre, C. Coiled coil- and Intermediate Filament- Proteins in the Plant Nucleoskeleton. In: *The Plant Cytoskeleton*. NATO Sciences Series A: Life Sciences. C. Lloyd and Y. Blume eds IOS Press (en prensa/in press)
 - Moreno Díaz de la Espina, S., Samaniego, R., Yu, W., and De la Torre, C. (2003) Intermediate filament proteins with nuclear function: NuMa, lamin-like proteins and MFP1. *Cell Biol. Int.* 27, 233 -235.
 - Pérez-Talavera, S., Carballo, J.A., and De la Torre, C. Unimpeded onset of proliferation and conserved processing of DNA damage in two *Allium* species after their challenge by ionizing radiation. *Plant Biosystems* (en prensa/in press)
-

Estrés y Muerte Celular

Cell Stress and Cell Death

PATRICIO ALLER TRESGUERRES
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ADRIÁN MARIO RAMOS (Desde IX-2002)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

DONNA AMRÁN COHÉN (Desde VII-2002)
CARLOS FERNÁNDEZ SÁEZ
MARÍA DEL ALBA GALÁN GARCÍA
PATRICIA SANCHO ANDRÉS
ALFONSO TROYANO DÍAZ
B. Predoctorales / Graduate Students

ELENA DE BLAS BROTONS
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Apoptosis, Necrosis, Proteínas de estrés, Drogas antitumorales, Células mieloides

Inducción de apoptosis y necrosis por drogas antitumorales e inductores de estrés

El tratamiento con drogas antitumorales - p.e., inhibidores de la replicación del DNA, como la citarabina; inhibidores de DNA topoisomerasas, como el etopósido, la doxorubicina o la camptotecina; agentes alquilantes, como el cisplatino o el melfalán; y el agente antileucémico As_2O_3 - puede provocar muerte apoptótica o necrótica, según el tipo celular y las condiciones experimentales. La muerte apoptótica es claramente preferible para el organismo, dado que evita la libre diseminación de residuos celulares y el daño subsiguiente del tejido circundante. Por ello, es importante conocer los mecanismos que regulan la inducción de apoptosis, y los factores que deciden la selección de uno u otro tipo de muerte celular.

Esta problemática está siendo investigada en nuestro laboratorio, utilizando preferentemente modelos de células leucémicas mieloides (promonocítica U937, mielomonocítica HL-60, y promielocítica aguda NB4) En concreto estamos estudiando: (1) La



Keywords: Apoptosis, Necrosis, Stress proteins, Antitumour drugs, Myeloid cells

Induction of apoptosis and necrosis by antitumour drugs and stress inducers

The treatment with antitumour drugs - DNA replication inhibitors, such as cytarabine; DNA topoisomerase inhibitors, such as etoposide, doxorubicin and camptothecin; alkylating drugs, such as cisplatin and melphalan, and the antileukemic agent As_2O_3 - may cause apoptosis or necrosis, depending on the cell type and the experimental conditions. Apoptosis is clearly advantageous for the organisms, since it prevents the free dissemination of cell debris and the consequent damage of the surrounding tissue. Hence, it is of great importance to underscore the mechanisms that regulate apoptosis induction, and the factors that decide the selection of one or the other mode of death.

These problems are under investigation in our laboratory, using leukaemia myeloid cell lines (U-937 promonocytic, HL-60 myelomonocytic, and NB4 acute promyelocytic) In particular, we are analysing: (1) The regulation of cell death by oxidative

regulación de la muerte celular por estrés oxidativo. Ello incluye la determinación de: (a) La producción de especies reactivas de oxígeno, y la acción protectora de agentes antioxidantes. (b) Los efectos de alteraciones en los niveles de glutatión (GSH), principal determinante del estado redox celular. (c) La peroxidación lipídica, y la señalización por aldehídos derivados de la peroxidación. Y (d) el estudio de los factores reguladores de la vía "intrínseca" de la apoptosis: funcionalidad mitocondrial, niveles de ATP, liberación de citocromo c y su modulación por miembros de la familia de Bcl-2, y activación de la cascada de caspasas. (2) Asimismo estamos analizando la señalización de la muerte celular por quinasas de la familia MAPK (JNK, p38 y ERKs) y PI3K/Akt, con especial interés en las relaciones entre actividades quinasas y oxidación celular.

Expresión de proteínas de estrés (HSPs) y resistencia celular

Una propiedad de algunos agentes físico-químicos es su capacidad de activar la respuesta de estrés, caracterizada a nivel molecular por la síntesis y acumulación de HSPs ("heat-shock proteins") El estudio de estas proteínas ha adquirido recientemente gran importancia al demostrarse que algunas de ellas (especialmente la HSP70 y la HSP27) inhiben el proceso de apoptosis, por lo que pueden contribuir al desarrollo del fenotipo tumoral y constituir un factor de resistencia a fármacos.

Nuestro trabajo actual consiste en el análisis de factores posiblemente implicados en la regulación de la respuesta de estrés, y de la relación entre expresión de HSPs y muerte celular. Utilizando los modelos celulares y alguno de los agentes citotóxicos arriba indicados, se trata de estudiar: (1) La regulación de la respuesta de estrés por oxidación celular, y su señalización por MAP quinasas. Ello incluye el análisis de la síntesis de las HSPs, y de los eventos tempranos de la respuesta de estrés - fosforilación, oligomerización y unión del factor HSF1 ("heat-shock factor 1") al DNA. (2) El efecto de la sobre-expresión de HSP70, o de la inhibición de su expresión, sobre la generación de muerte apoptótica y necrótica y sobre la ejecución de los distintos eventos reguladores de la vía "intrínseca" de la apoptosis (punto 1d del apartado anterior)

stress. This includes the determination of: (a) The generation of reactive oxygen species, and the protective action of antioxidant agents. (b) The effects of changes in glutathione (GSH) levels, the main determinant of the redox state in the cell. (c) The changes in lipid peroxidation, and the signalling by aldehydes derived of peroxidation. And (d) the alterations in factors which regulate the "intrinsic" pathway of apoptosis, such as mitochondrial function, ATP levels, liberation of cytochrome c from mitochondria to the cytosol and its regulation by proteins of the Bcl-2 family, and activation of the caspase cascade. (2) In addition, we are studying cell death signalling by MAP (JNK, p38 and ERK) and PI3K/Akt kinases, with special interest in the relationships between kinase activities and intracellular oxidation.

Expression of stress proteins (HSPs) and cell resistance

One of the properties of some physical and chemical agents is the capacity to induce the stress response, characterised by the synthesis and accumulation of HSPs ("heat-shock proteins") The study of these proteins recently became a subject of great interest, due to their capacity (especially HSP70 and HSP27) to inhibit apoptosis. In fact, the over-accumulation of some HSPs may contribute to the development of the malignant phenotype, and to the acquisition of resistance against antitumor drugs.

We are presently investigating the mechanisms of control of the stress response in myeloid cells, and the relationship between HSPs expression and cell death. In particular, using some of the above-indicated cell lines and cytotoxic drugs, we are analysing: (1) The regulation of the stress response by intracellular oxidation, and their signalling by MAP kinases. This includes the expression of HSPs as well as the modulation of the early events of the stress response - phosphorylation, oligomerisation and binding of HSF1 ("heat-shock factor 1") to DNA. (b) The effect of changes in HSP70 expression - inhibition or over-expression - on the generation of apoptotic and necrotic cell death, and on the execution of the events which regulate the "intrinsic" pathway of apoptosis (as indicated in point 1d of the previous section)

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGESIC, PM97-0144 (1998-2001)
- FIS, 01/0946 (2001-2003)
- CAM, 08.3/0011/2001 (2002-2004)
- MCYT, SAF2001-1219 (2001-2004)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Alfonso Troyano Díaz. Función de la oxidación celular en la generación de muerte apoptótica y necrótica en células promonocíticas humanas. Universidad Complutense, 2002. Director: Dr. Patricio Aller.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Galán, A., Troyano, A., Vilaboa, N.E., Fernández, C., De Blas, E., and Aller, P. (2001) Modulation of the stress response during apoptosis and necrosis induction in cadmium-treated U-937 human promonocytic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1538, 38-46.
- Galán, A., García-Bermejo, L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., Fernández, C., De Blas, E., and Aller, P. (2001) The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays). *Eur. J. Cell Biol.* 80, 312-320.
- Troyano, A., Fernández, C., Sancho, P., De Blas, E., and Aller, P. (2001) Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation. *J. Biol. Chem.* 276, 47107-47115.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Sancho, P., Troyano, A., Fernández, C., De Blas, E., and Aller, P. (2002) Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. *Mol. Pharmacol.* (en prensa/in press)
-

Regulación de Expresión de Genes Eucariotas

Eukaryotic Gene Expression

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

LUCIA CALLEJA (Hasta XII-2001)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

EMILIANO GARCÍA PIZARRO (Hasta XII-2001)
M^a DEL MAR LORENTE PÉREZ
MELGAR FERNÁNDEZ DE HENESTROSA (Desde VI-2002)
B. Predoctorales / Graduate Students

NOEMI ARELLANO SÁNCHEZ (Desde I-2002)
Personal Técnico / Technician

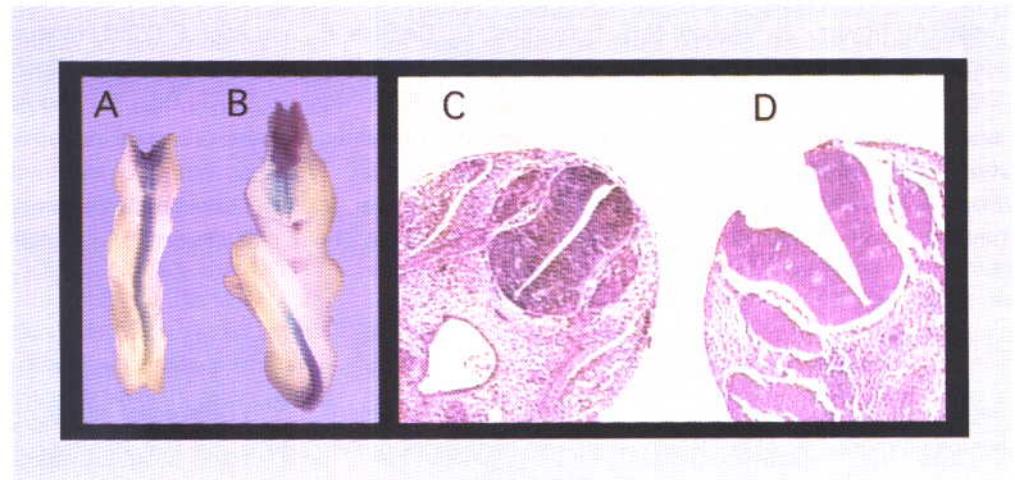


Figura: (A,B) Expresión de un transgen Ring1A-lacZ en el tubo neural de embriones de 8.5 (A) y 9.5 (B) días de desarrollo visualizada mediante la detección histoquímica (color azul) de la actividad β -galactosidasa del gen lacZ de *E. coli*. (C,D) Secciones de embriones de 11.5 de desarrollo mostrando alteraciones en el cierre del tubo neural en ratones deficientes en Ring1A y M33 (D) en comparación con el de embriones normales o con mutaciones en Ring1A o M33 (C)

*Figure: (A,B) Expression pattern of a lacZ gene driven by Ring1A genomic sequences in 8.5 dpc (A) and 9.5 dpc (B) embryos. The transcriptional activity of the transgene is visualized (blue) by the β -galactosidase activity of the lacZ gene of *E. coli*. (C,D) Tissue sections of 11.5 dpc mouse embryos showing the closed neural tube of wild type or mutant embryos lacking either Ring1A or M33, compared to the open neural tube of Ring1A and M33 compound mutant embryos (D)*

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

Nuestro laboratorio estudia la función de los productos de genes del grupo Polycomb (PcG), un sistema evolutivamente conservado implicado en el mantenimiento de estados transcripcionales inactivos. Los productos de los genes PcG forman complejos que se asocian a la cromatina, aunque el mecanismo(s) molecular(es) a través del que ejercen su función no está caracterizado(s). Mutaciones en genes que codifican proteínas PcG producen alteraciones en el desarrollo embrionario, así como en la actividad proliferativa de una variedad de tipos celulares.

Caracterización funcional de genes del grupo Polycomb (PcG) de ratón. Análisis genético de la función de las proteínas Ring1A y Ring1B (Rnf2)

Recientemente, utilizando modelos animales de ganancia y pérdida de función, hemos determinado que Ring1A, un gen sin homólogo con función PcG en *D. melanogaster*, es un gen nuevo del grupo PcG. Sin embargo, en colaboración con los grupos de la Dra. I. Guerrero (CBM, Madrid) y S. Pimpinelli (Universidad de Roma) hemos obtenido evidencia de esta función en moscas, determinando el patrón de asociación de Dring1, el producto del ortólogo de *D. melanogaster* de los genes Ring, a cromosomas politénicos, así como la conservación funcional de las proteínas de mosca y ratón.

Para investigar los papeles individuales de los distintos genes PcG hemos iniciado un estudio de las interacciones genéticas entre algunos de ellos, mediante la generación de líneas de ratones con mutaciones constitutivas en pares de genes PcG (*Ring1A, M33; Ring1A, Bmi1*) El estudio de estos ratones muestra contribuciones singulares de cada uno de ellos durante la determinación de la identidad del eje antero posterior (patrones de expresión de genes Hox, alteraciones del esqueleto axial). Esto es particularmente evidente en animales en los que combinamos mutaciones de pérdida de función de *Bmi1* o *M33* y ganancia de función de *Ring1A*.

En la actualidad estamos generando líneas de ratones con mutaciones condicionales en el locus *Rnf2*.

Keywords: Polycomb genes, Ring1A, Rnf2, RYBP, Hox genes, Transgenic and knock-out mice

Our laboratory is interested in the study of the function of the Polycomb group (PcG) of genes, which constitute an evolutionary conserved system involved in the maintenance of transcriptionally repressed states. The products of the PcG genes form chromatin-bound complexes, although the precise molecular mechanism(s) through which they act is not known. Mutations in PcG genes result in alterations of embryonic development and of the proliferative properties of a number of cell types.

Functional characterization of PcG genes. Genetic analysis of the murine Ring1A and Ring1B (Rnf2) genes

*Using mouse gain- and loss-of-function mouse models, we have shown a PcG function for Ring1A, a gene without a PcG homolog in *D. melanogaster*. More recently, in collaboration with Dr. I. Guerrero (CBM, Madrid) and Dr. S. Pimpinelli (Roma University) we demonstrated a Ring1-related PcG function in flies. We found that Dring, the *D. melanogaster* ortholog of vertebrate Ring1 genes, is associated to approx. 100 loci in polytenic chromosomes, many of which also bind other PcG proteins. We also showed that mouse and fly Ring1 proteins are functionally conserved.*

On the other hand, to investigate putative individual roles of PcG genes we set out to analyze possible genetic interactions between them. We have generated mouse lines bearing compound mutations for Ring1A and M33 and also for Ring1A and Bmi1. We also generated mice deficient in Bmi1 or M33 in which the levels of Ring1A have been increased by means of conventional transgenesis. The study of these mice (axial skeleton, Hox gene expression patterns) shows differential roles for each of these genes in the determination of cell identities along the antero-posterior axis.

Currently we are generating mouse lines bearing modified Rnf2 alleles for their conditional inactivation.

Función de RYBP (proteína que interacciona con Ring1 y YY1)

Anteriormente habíamos identificado cDNAs que codifican para una proteína nueva que interacciona directamente con las proteínas Ring1. Esta proteína también interacciona con YY1, el producto del ortólogo del gen PcG pleiohomeotic (pho) de *Drosophila*. Tanto YY1 como pho se unen a DNA y podrían así contribuir a la asociación específica de complejos PcG a DNA y de hecho se ha demostrado que RYBP, en colaboración con YY1, regula algunos de los promotores controlados por proteínas de la familia E2F. Para el análisis funcional de RYBP en ratón hemos generado (en colaboración con el Dr. H. Koseki de la Universidad de Chiba) un mutante constitutivamente deficiente en RYBP, cuya caracterización se encuentra en progreso.

Proteínas PcG y el fenotipo tumoral

Para investigar un posible papel de proteínas PcG en el origen y desarrollo del fenotipo tumoral hemos iniciado un análisis sistemático de la expresión de genes PcG utilizando matrices de tejidos humanos y nuestros anticuerpos contra proteínas PcG. Este estudio forma parte de un proyecto coordinado con la Dra. Sánchez Beato, del CNIO.

Functional analysis of RYBP (Ring1 and YY1 binding protein)

Recently we have identified a new cDNA which encodes a protein that binds Ring1A and Ring1B but that also binds the DNA binding protein YY1, the product of the mammalian ortholog of the pleiohomeotic (pho) PcG gene of flies. Because of its ability to bind YY1, RYBP may be involved in targeting PcG complexes to specific loci. Whether related or not to PcG function, it has been shown a role for RYBP, together with YY in regulating E2F target genes. In order to gain some insight on the RYBP function during mouse development we have generated (in collaboration with Dr. H. Koseki, Chiba University) a mouse line lacking RYBP. The characterization of this mutant line is in progress.

PcG proteins and the tumoral phenotype

To study a possible role of PcG genes in the cellular transformation processes associated with the tumoral phenotypes, we are analysing PcG expression patterns in tissue arrays of both normal and tumoral tissues using our antibodies to PcG proteins. This subproject is part of a coordinated effort with IDra. Sánchez Beato at the CNIO in Madrid.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, 08.1/0050/2000.1 (2000-2001)
- MCYT, SAF2001-2211-C02-01 (2001-2003)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Akasaka, T., vanLohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A., and Koseki, H. (2001) Mice double deficient for the Polycomb-group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of *Hox* gene expression. *Development* 128, 1587-1597.
 - Atsuta, T., Fujimura, S., Moriya, H., Vidal, M., Akasaka, T., and Koseki, H. (2001) Production of monoclonal antibodies against mammalian *Ring1B* proteins. *Hybridoma* 20, 43-46.
 - Peters, B., Kirfel, J., Büssow, H., Vidal, M., and Magin, T.M. (2001) Complete cytolysis and neonatal lethality in keratin 5 knockout mice reveals its fundamental role in skin integrity and in epidermolysis bullosa simplex. *Mol. Biol. Cell* 12, 1775-1789.
 - Ramírez, A., Milot, E., Ponsa, I., Marcos-Gutiérrez, C., Page, A., Santos, M., Jorcano, J., and Vidal M. (2001) Sequence and chromosomal effects on variegated expression of keratin 5/*lacZ* constructs in stratified epithelia of transgenic mice. *Genetics* 158, 341-350.
 - Schlisio, S., Halperin, T., Vidal, M., and Nevins, J.R. (2002) Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function. (2002) *EMBO J.* 21, 5775-5786.
 - Suzuki, M., Mizutani-Koseki, Y., Fujimura, Y.I., Miyagishima, H., Kaneko, T., Takada, Y., Akasaka, T., Tanzawa, H., Takihara, Y., Nakano, M., Masumoto, H., Vidal, M., Isono, K.I., and Koseki, H. (2002) Involvement of the Polycomb-group gene *Ring1B* in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development* 129, 4171-4183.
-

Control Transcripcional en Eucariotas

Control of Transcription in Eucariotes

JAVIER REY CAMPOS

BEGOÑA GRANADINO GOENECHEA

Jefe de Grupo / Group Leader

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

PALOMA SÁNCHEZ APÁRICIO (Desde III-2001)

B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

SERGIO CASAS TINTO

MARÍA ANA GÓMEZ FERRERÍA

FERNANDO MARTÍN DE LARA

B. Predoctorales / Graduate Students

MARÍA JOSEFA FERNÁNDEZ-CABRERA (Hasta IX-2000)

Personal Técnico / Technician

Introducción

En el nuestro laboratorio hemos venido investigando las funciones y modo de actuación de varios factores de transcripción de la familia fork head que hemos identificado. Mantenemos dos líneas de trabajo independientes aunque conceptualmente relacionadas. Una de ellas se centra en el estudio de los factores FOXJ2 y FOXJ3 en mamíferos (línea liderada por J. Rey Campos). La otra línea se centra en el estudio del papel de los factores fork head DmFoxF y DmMNF en el desarrollo de *Drosophila* (línea liderada por B. Granadino)

Palabras clave: FOXJ2 (FHX), FOXJ3 (KIAA1041), Desarrollo embrionario pre-implantación, Fork head, Ovario, *Drosophila*, Mesodermo, DmFoxF, DmMNF

Factores fork head de mamíferos FOXJ2 y FOXJ3

FOXJ2 y FOXJ3 (antes denominados FHX y KIAA1041 respectivamente) son dos factores fork head altamente homólogos. Nuestros estudios sugieren que probablemente surgieron en la

Introduction

*In our laboratory we have been investigating the functions and the mechanisms of several transcription factors of the fork head family, which have been identified by us. We have two independent, although conceptually related, research lines. One of them focuses on the study of the FOXJ2 and FOXJ3 factors in mammals (line headed by J. Rey Campos). The other research line focuses on the study of the *Drosophila* fork head factors DmFoxF and DmMNF and their role in embryonic development (line headed by B. Granadino)*

Keywords: FOXJ2(FHX), FOXJ3(KIAA1041), pre-implantation embryonic development, fork head, ovary

Mammalian fork head factors FOXJ2 and FOXJ3 (J. Rey Campos)

FOXJ2 y FOXJ3 (formerly known as FHX y KIAA1041 respectively) are two highly homologous fork head factors. Our studies suggest that both genes derived from a common ancestral

evolución a partir de un único gen ancestral por un proceso de duplicación de una región cromosómica completa que incluía también a otros genes no relacionados.

FOXJ2 es un activador transcripcional que en el hombre se expresa como dos isoformas con distinta capacidad transcripcional. Reconoce dos tipos de secuencias en el DNA que están presentes en muchos genes. FOXJ2 se expresa en numerosos tejidos y órganos adultos y embrionarios aunque no en todos los tipos celulares. En el desarrollo pre-implantación de ratón FOXJ2 comienza a expresarse en el estadio de 8 células y se mantiene durante todo el desarrollo.

FOXJ3 muestra expresión materna (se expresa en oocitos sin fecundar) y expresión zigótica muy temprana, detectándose desde el estadio de 2-células. FOXJ3 es capaz de interactuar con las mismas secuencias de DNA que FOXJ2, aunque muestra una preferencia de secuencia diferente, lo que sugiere que los genes diana para FOXJ3 probablemente sean distintos de aquellos de FOXJ2. Sin embargo, en determinadas circunstancias podría existir solapamiento funcional entre ambos factores de transcripción.

Actualmente nuestros objetivos se centran en conocer los genes cuya expresión está regulada por FOXJ2 y FOXJ3 y las funciones biológicas que desempeñan, tanto en el desarrollo embrionario como en el individuo adulto. Para ello estamos desarrollando ratones transgénicos de sobre-expresión de FOXJ2 y FOXJ3, así como ratones knock-out de pérdida de función de ambos genes. Por otro lado, de manera más dirigida, estamos investigando el papel de FOXJ2 en la expresión de algunos genes que son relevantes en la fisiología del ovario y que son dianas potenciales de este factor de transcripción.

Factores fork head de *Drosophila* DmFoxF y DmMNF (B. Granadino)

Con esta línea de investigación pretendemos abordar el estudio de un grupo de factores de transcripción que pueden jugar un papel muy importante en los procesos de diferenciación y desarrollo del mesodermo. Esta capa embrionaria da lugar a muchos órganos y tejidos del organismo adulto, como por ejemplo la musculatura. Además, el mesodermo tiene un papel inductor de procesos de diferenciación de tejidos circundantes derivados de las otras capas embrionarias primarias: el endodermo y el ectodermo. FOXF1, FOXF2 y MNF, son factores de transcripción de

gene by a genomic duplication event of a larger chromosomal region, which also included other unrelated genes.

FOXJ2 is a transcriptional activator that, in humans, is expressed as two different isoforms with differential transcriptional capacity. It is able to bind to two different types of DNA sequences, which are found in many genes. This fork head factor can be found in many adult tissues and organs, as well as during embryonic development, although not all cell types express it. During pre-implantation embryonic development, FOXJ2 expression starts very early, at the 8-cell stage, and after its expression is maintained until the adult.

FOXJ3 shows maternal expression (it is expressed in non-fertilized oocytes). Its zygotic expression also starts very early (as soon as the embryo is in the 2-cell stage). FOXJ3 is able to bind to the same DNA sequences as FOXJ2, although it shows differential sequence specificity. This suggests that FOXJ2 and FOXJ3 probably regulate the expression of different sets of target genes. However, for some genes, the functions of both factors may overlap.

Our current goals are the identification of the genes the expression of which is regulated by FOXJ2 and/or FOXJ3, and to determine the biological functions of both transcription factors, in the embryo and in the adult. To do so, we are developing transgenic mice models that over express FOXJ2 or FOXJ3 in different locations and also knock-out mice for both genes. On the other hand, we are also investigating the role of FOXJ2 in the expression of some genes, which are relevant for the ovary physiology, that are potential targets for this transcription factor.

***Drosophila* fork head factors DmFoxF y DmMNF (B. Granadino)**

In this research line we are interested in the study of transcription factor involved in the development and differentiation of the mesoderm. The mesoderm will form in the adult different tissues and organs as the somatic and visceral muscles. Mesoderm has also an inductor function in the differentiation of surrounding tissues derived from the endoderm or the ectoderm. FOXF1, FOXF2 and MNF are fork head transcription factors, involved in different developmental processes related with the mesoderm. FOXF1 and FOXF2 are involved in epithelio-mesenchymal interactions of lung and gut morphogenesis. MNF

la familia fork head que han sido implicados en algunos procesos de desarrollo en los que interviene el mesodermo. FOXF1 y FOXF2 parecen ser importantes en las interacciones mesénquima-epitelio que tienen lugar durante el desarrollo y la diferenciación del sistema respiratorio y del tubo digestivo. MNF se expresa en células stem miogénicas del músculo adulto, y podría tener un papel importante en la regeneración muscular después de una lesión. En nuestro laboratorio hemos encontrado los homólogos de estos genes en *Drosophila*. FOXF1 y FOXF2 están representados en la mosca por un único factor al que hemos denominado DmFoxF. Este factor podría desempeñar en *Drosophila* las funciones de sus ortólogos de vertebrados. MNF está representado en *Drosophila* por un único gen, al que hemos denominado DmMNF. El disponer de los genes ortólogos en la mosca de estos factores de transcripción tan importantes en la biología del mesodermo, nos permite abordar el estudio de sus funciones de una manera mucho más fácil debido a la potencia del análisis genético en este organismo. Además, esto nos permitirá también establecer paralelismos entre las funciones de estos genes entre vertebrados e invertebrados, lo que pondría de manifiesto mecanismos básicos conservados en la evolución, que sugeriría una importancia básica en la biología del desarrollo del mesodermo.

El gen DmFoxF

DmFoxF está localizado en el cromosoma 3L en las bandas citogenéticas 65D4-65E1. El gen se extiende al menos 4 Kpb y comprende 4 exones. El cDNA tiene al menos 2582 nucleótidos, con una fase de lectura abierta de 1992 nucleótidos, que codifican para una proteína de 664 aminoácidos con un 63% de homología en su dominio fork head con el dominio fork head de FOXF1 y FOXF2 de vertebrados.

Expresión de DmFoxF

El gen se expresa en todos los estadios de desarrollo: embrión, larva, pupa y adulto. Hemos analizado el patrón de expresión de DmFoxF durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* mediante inmunohistoquímica. La proteína se empieza a observar en embriones de estadio 10-11 en clusters segmentales de células precursoras del mesodermo visceral. La proteína se localiza en el núcleo, como es esperado para un fac-

is expressed in myogenic stem cells (satellite cells) of adult animals, and acts to regulate genes that co-ordinate the proliferation and differentiation of these cells after muscle injury. We have cloned the Drosophila homologous genes: DmFoxF and DmMNF, which will allow us the study of the biological functions of these genes due to the genetics advantages of this organism. Moreover, we could establish parallelisms between the biological functions of these genes in vertebrates and invertebrates, what would show basic mechanism in the mesoderm development, conserved during evolution.

The DmFoxF gene

DmFoxF is located on the third chromosome at the band 65D4-65E1. The gene spans at least 4Kpb and contains four exons. DmFoxF transcript spans at least 2582 nucleotides, with an ORF of 1992 nucleotides. It codes a 664 amino acid polypeptide, which shows a 63% homology, in its DNA binding domain, with the sequences of vertebrate FOXF1 and FOXF2.

Expression of DmFoxF during development.

DmFoxF is expressed in all main developmental stages: embryos, larvae, pupae and adults. The DmFoxF protein was first detected in stages 10-11 embryos, at the segmental cell clusters that include the presumptive midgut visceral mesoderm. As development progresses, DmFoxF protein expression appears to be restricted to columnar cells, which connect to each other to form a continuous band of visceral mesoderm. The homeotic genes that are expressed in the viscera, control morphogenesis and differentiation of the midgut. The gastric caeca at parasegment 3, and the midgut constrictions at parasegments 5/6, 7/8 and 9/10 depend on the expression of Scr, Antp, Ubx and abd-A. DmFoxF is required in conjunction with Ubx, to activate dpp expression in parasegment 7 of the visceral mesoderm, which in turn controls midgut morphogenesis.

The DmMNF gene

DmMNF is located on the third chromosome at the band 68A4. The gene contains nine exons and code for different transcripts, which differ at the 5'UTR. DmMNF expresses as two different sized isoforms: the isoform I spans 654 amino acids and

tor de transcripción. A medida que avanza el desarrollo, se observan dos tipos de células en estos clusters: las células ventrales con una morfología columnar y las células dorsales con una morfología hexagonal. En estas etapas la proteína de *Drosophila* se restringe a las células columnares, que posteriormente se fusionan formando una banda continua que constituye el mesodermo visceral que dará lugar a la musculatura del tubo digestivo medio.

Al final de la embriogénesis el mesodermo visceral determina la formación de tres constricciones en posiciones específicas del tubo digestivo medio. La formación de la ceca gástrica en el parasegmento 3 y las constricciones anterior, media y posterior, en los parasegmentos 5/6, 7/8 y 9/10 respectivamente, dependen de la expresión de los genes homeóticos *Scr*, *Antp*, *Ubx* y *abd-A*. La expresión de *DmFoxF* en el mesodermo visceral, nos sugirió una posible función de este gen en las interacciones mesodermo-endodermo, que determinan la formación de estas constricciones. Resultados posteriores del grupo de M.Frasch, demostraron que *DmFoxF* activa al gen *dpp* induciendo la formación de la 2ª constricción en el parasegmento 7.

El gen *DmMNF*

El gen se localiza en el cromosoma 3L en la banda citogenética 68A4. El gen comprende 9 exones y da lugar a distintos mRNAs que difieren en el extremo 5' UTR. Codifica para dos isoformas: la isoforma mayor, denominada S, tiene 740 aminoácidos, y la isoforma pequeña o I, 654 aminoácidos. Estas proteínas contienen un dominio fork head idéntico y difieren en la región C-terminal, en la que la isoforma S contiene un dominio adicional rico en glutaminas, cuya función desconocemos hasta el momento.

El dominio fork head de *DmMNF* tiene una homología del 70% con el dominio fork head de la proteína MNF de mamíferos.

Expresión de *DmFoxF*

El gen se expresa en todos los estadios de desarrollo de la mosca: embriones, larvas, pupas y adultos. Mientras que en embriones y larvas predomina la isoforma I, en pupas y adultos la isoforma mayoritaria es la S. Mediante hibridaciones *in situ*, así como por inmunohistoquímica, hemos visto que este gen se

the isoform S spans 740 amino acids. Both isoforms contain the same DNA binding domain. The S isoform contains an extra glutamine rich domain in its C-terminal region. The DmMNF protein shows a 70% homology, in its DNA binding domain, with the sequence of vertebrate MNF.

Expression of *DmMNF* during development.

DmMNF is expressed in all main developmental stages: embryos, larvae, pupae and adults. While embryos and larvae express predominantly the I isoform, pupae and adults express the S isoform. During embryogenesis, DmMNF RNA and protein were detected in two regions of the midgut endoderm, that correspond to parasegments 3 and 7. dpp is expressed in the visceral mesoderm surrounding these regions, what suggest that DmMNF could be regulated by dpp. With the UAS/Gal4 system we have shown that ectopic expression of dpp in the entire visceral mesoderm, expands the expression of DmMNF in the endoderm, thus indicating that DmMNF is regulated by the signal transduction pathway of dpp.

expresa durante el desarrollo embrionario en el parasegmento 3 y 7 del endodermo del tubo digestivo medio. En el mesodermo visceral adyacente de estas regiones, se expresa *dpp* que pertenece a la superfamilia de los TGF β . Estos datos sugieren que DmMNF podría estar regulado por *dpp*. Para comprobar esta hipótesis hemos analizado la expresión de DmMNF en moscas que sobreexpresan *dpp* en todo el mesodermo visceral mediante el sistema UAS/GAL4. Nuestros datos muestran una expansión de los dominios de expresión de DmMNF en estos embriones que sobreexpresan *dpp*, sugiriendo que DmMNF responde a la vía de señalización de *dpp* en la diferenciación del tubo digestivo medio.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MCYT PGC, PM99-0103 (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Carmen Arias de la Fuente. Estudio de la función biológica del factor de transcripción FHX. Universidad Autónoma de Madrid, 2001. Director: Javier Rey Campos.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Pérez-Sánchez, C., Casas-Tinto, S., Sanchez, L., Rey-Campos, J., and Granadino, B. (2002) Cloning and characterization of DmFoxF, a novel *Drosophila* fork head factor expressed in visceral mesoderm. *Mech. Dev.* 111, 163-166

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Gómez-Ferrería, M., and Rey-Campos, J. (2003) Functional domains of FOXJ2. *J. Mol. Biol.* (en prensa/in press)
 - Granadino, B., and Rey-Campos, J. (2003) The Magerit cluster, an old association of non related genes preserved throughout evolution. *J. Mol. Evol.* (en prensa/in press)
-

Eliminación de Cromosomas en Insectos

Chromosome Elimination in Insects

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

PATRICIA GONZÁLEZ GRECIANO
B. Predoctoral / Predoctoral Fellow

Palabras clave: Cromosomas, Eliminación, Impronta genómica, Acetilación de histonas, *Sciara*

Keywords: *Chromosome elimination, Imprinting, Histone acetylation, Sciara*

Eliminación de cromosomas en *Sciara*

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

Un aspecto que nos interesa es conocer los mecanismos celulares responsables de los diferentes procesos de eliminación de cromosomas durante el desarrollo de *Sciara*. Mediante el uso de anticuerpos que reconocen diferentes proteínas cromosómicas y anticuerpos que reconocen diferentes componentes del aparato microtubular, hemos caracterizando las modalidades de segregación atípica de los cromosomas de origen paterno en células de la línea germinal de *S. ocellaris* y *S. coprophila*.

Otro aspecto que abordamos es averiguar cuales son las señales moleculares involucradas en el comportamiento diferencial de los cromosomas según sea su origen parental durante los fenómenos de eliminación. Hemos investigado en *S. ocellaris* y *S. coprophila* si existen diferencias o modificaciones de la cro-

Chromosome elimination in sciarid flies

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

*We are currently interested in the cellular mechanisms underlying the different chromosome elimination processes during *Sciara* development. By means of antibodies against different chromosomal proteins and against spindle components we have characterized the abnormal chromosome segregation modalities of paternal chromosomes in somatic and germline cells of *S. ocellaris* and *S. coprophila*.*

*We have also focussed in studying the molecular signals implicated in the differential chromosome behaviour depending on their parental origin during chromosome elimination. We investigated chromatin differences between parental chromosomes in *Sciara ocellaris* and *S. coprophila* by analyzing histone acetylation modifications in early germ nuclei. We examined germ nuclei from early embryonic stages to premeiotic larval stages, male meiotic cell and early somatic nuclei following fer-*

matina debidos a la acetilación diferencial de histonas entre los cromosomas paternos/maternos. Mediante anticuerpos específicos que reconocen acetilación de las histonas H4 y H3 en diferentes residuos de lisinas, se han examinado núcleos germinales a partir de estadios embrionarios tempranos hasta estadios larvales premeióticos, células meióticas masculinas y núcleos somáticos tras la fertilización. En células germinales tempranas únicamente la mitad del complemento cromosómico regular está altamente acetilado para las histonas H4 y H3. Los cromosomas que están altamente acetilados son los de origen paterno con la excepción del cromosoma X paterno que es eliminado de los núcleos germinales. En estadios más tardíos, precediendo la iniciación de las divisiones mitótico-goniales, todos los cromosomas del complemento muestran niveles similares en la acetilación de las histonas H4 y H3. Durante la meiosis masculina, mientras que los cromosomas maternos están altamente acetilados para las histonas H4/H3 el grupo de cromosomas paternos que es eliminado presenta una baja acetilación. Estos resultados indican que la acetilación de las histonas contribuye a especificar el comportamiento sometido a impronta de los cromosomas germinales en los Ciáridos. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con Maria Fernanda Ruiz del grupo de L. Sánchez (CIB, CSIC)

tilization. In early germ cells, only half of the regular chromosome complement is highly acetylated for histones H4 and H3. The chromosomes that are highly acetylated are paternally derived. An exception is the paternal X chromosome that is eliminated from germ nuclei. At later stages preceding the initiation of mitotic gonial divisions, all chromosomes of the germline complement show similar high levels of histone H4/H3 acetylation. In male meiosis, maternal are highly acetylated for histones H4 and H3, whereas the entire paternal chromosome set undergoing elimination appears under-acetylated. The results suggest that histone acetylation contributes towards specifying the imprinted behavior of germline chromosomes in sciarids. This work was done in collaboration with MF Ruiz (CIB, CSIC)

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGYCYT, BMC2000-0901 (2000-2003)
- CAM, 08.6/0044/2001 (2000-2004)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Goday, C., and Esteban, M.R. (2001) Chromosome elimination in sciarid flies. *BioEssays*. 23, 242-250.
- Panzera, Y., Estebán, M.R., De la Hera, A., and Goday, C. (2001) Meics, a novel zinc finger protein which relocates from nuclei to the central meiotic spindle during *Drosophila* spermatogenesis. *Mech. Dev.* 106, 151-4.
- Goday, C., and Ruiz, M.F. (2002) Differential acetylation of histones H3 and H4 in paternal and maternal germline chromosomes during development of sciarid flies *J. Cell Sci.* 115, 4765-4775.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Ruiz, MF, Goday C, González P, and Sánchez L. (2003) Molecular analysis and developmental expression of the Sex-lethal gene of *Sciara ocellaris* (Diptera Order, Nematocera Suborder) *Mech Dev.* (en prensa/in press)
-

Citogenética Molecular

Molecular Cytogenetics

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

GLORIA MÓRCILLO ORTEGA
Doctora Vinculada / Associated Scientist

GERALD BERGTROM
Científico Invitado / Visitant Scientist (VIII a XII 2001)

CRISTINA SANZ HERMIDA (Hasta VII-2001)
Bécaria Predoctoral / Graduate Student

CRISTINA IGLESIAS GUIBASOLA
AMELIA PARTEARROYO LACABA
Personal Técnico / Technicians

Organización de lo telómeros en *Chironomus*

La organización telomérica en Dípteros difiere de la que se ha encontrado en la mayoría de los eucariotes analizados hasta ahora. En los insectos pertenecientes a los Dípteros los telómeros están formados por bloques de secuencias complejas repetidas de 175-340 bp en vez de las secuencias cortas de 6-25 bp, muy conservadas, que se encuentran en la mayoría de los organismos. Esta diferente organización se corresponde con diferencias en los mecanismos encargados del mantenimiento de la integridad de los telómeros. El complejo enzimático RNA/proteína conocido como telomerasa está en la base del mecanismo ampliamente conservado en una gran variedad de organismos. Este complejo es capaz de añadir secuencias cortas repetidas a los extremos de los cromosomas. En Dípteros, la elongación de los telómeros no parece depender de telomerasa, sino de un mecanismo alternativo, poco conocido en la actualidad. El conocimiento de este mecanismo posee un interés considerable para comprender la evolución de los procedimientos mediante los cuales diferentes organismos han enfrentado el problema de compensar el acortamiento de los telómeros causado por la replicación del cromosoma eucariótico.

Telomeric organization in Chironomus

Telomeric organization in Dipteran differs from those found in most of eucaryotes studied so far. Dipteran insects telomeres are formed by blocks of repeated complex sequences of 175-340 bp instead of the short well conserved 6-25 bp present in the majority of the organisms. Differences in organization correlate with differences in the mechanisms of maintenance of telomeric integrity. The enzymatic complex RNA/protein called telomerase mediates the mechanism widely conserved among a great variety of systems. This complex is able to add repeated short sequences to the chromosome ends. In Dipteran, the elongation of telomeres does not depend on telomerase, following a process largely unknown, at present. The elucidation of this mechanism is of considerable interest to understand the evolution of the way by which different organisms cope with the problem of compensating the shortening of the telomeres caused by the eucaryotic chromosome replication.

*During the two-year period here considered, we have characterized the telomeric sequences of *Chironomus thummi*. Besides, regulatory elements of the stress response integrated in the telomeric sequences have been identified. This finding pro-*

Durante el bienio considerado, hemos caracterizado las secuencias teloméricas de *Chironomus thummi*. Por otro lado, se han identificado elementos reguladores de la respuesta al estrés integrados en las secuencias de los telómeros de esta especie.

Estos resultados proporciona una explicación a nivel molecular de la activación de los telómeros mediante choque térmico. En la actualidad, estamos estudiando la implicación de ciertos sistemas enzimáticos en la elongación de los telómeros en nuestro modelo experimental.

Cambios de la estructura de la cromatina asociados a la transcripción

El objetivo global de este proyecto es analizar en *Chironomus* algunos aspectos básicos de los cambios de la estructura de la cromatina asociados a la transcripción. En particular, estamos interesados en comparar la estructura de la cromatina activa transcrita por RNA pol II con la transcrita por RNA pol I, bien caracterizada. Algunas peculiaridades del modelo *Chironomus*, como los anillos de Balbiani, proporcionan ciertas ventajas de tipo experimental para este estudio. La organización de la unidades de transcripción en estas estructuras posee semejanzas con las de los genes ribosómicos, sobre todo en relación con la densidad de polimerasas. En este bienio, se ha completado el estudio de la cromatina ribosomal en *Chironomus* empleando la técnica del "Psoralen Gel Retardation Assay". Por otro lado, se ha continuado el análisis de la cromatina de los anillos de Balbiani en distintos estados transcripcionales, habiéndose encontrado diferencias con la cromatina ribosomal que están siendo analizadas. Finalmente, se ha iniciado el estudio de la cromatina telomérica en *Chironomus thummi* utilizando la técnica del psoraleno, cuyo posible interés radica en conocer dicha estructura en un sistema independiente de telomerasa.

Organización nucleolar en células politenizadas de Chironomus

Este proyecto que se desarrolla en colaboración con el grupo del Dr. J. Medina. Los aspectos generales del mismo se exponen en esta memoria en el apartado correspondiente al citado grupo.

vides the molecular basis to explain the telomeric activation by heat shock of C. thummi telomeres.

At present, we are studying the possible implication of some enzymatic systems in the elongation of telomeres in our experimental model.

Changes of the chromatin structure associated to transcription

The main goal of this research is to study some basic questions about the changes of the chromatin structure associated to transcriptional activity in Chironomus. In particular, we are interested in the comparison of the structure of active chromatin transcribed by RNA pol II and the well known ribosomal chromatin transcribed by RNA pol I. Specific features of this model as the Balbiani rings provide some experimental advantages for this investigation. Transcription units in the BRs are rather comparable to ribosomal ones mainly regarding their polymerases density. We have characterized the situation of the ribosomal chromatin in different tissues of Chironomus larvae by the "Psoralen Gel Retardation Assay" and made progress in the analysis of BRs chromatin in different transcriptional states. Chromatin structure of both kind of active genes have shown striking differences which are being analyzed. We have extended the psoralen cross-linking method to the analysis of the telomeric chromatin in a telomerase-independent system as Chironomus.

Functional organization of the nucleolus in polytene cells

This research is being carried out in collaboration with Dr. J. Medina's group. General aspects of this project are described in the report corresponding to this laboratory.

Organismos financiadores/Founding Agencies

- MCYT, PB98-0646 (2000-2002)
- BMC-1141 (2001-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Cristina Sanz Hermida. Estructura de la cromatina y actividad transcripcional en células politenizadas. Universidad Autónoma de Madrid, 2001. Director: Dr. José Luis Díez Cortes

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Martínez, J.L., Edström, J.E., Morcillo, G., and Díez, J.L. (2001) Telomeres in *Chironomus thummi* are characterized by different subfamilies of complex DNA repeats. *Chromosoma* 110, 221-227.
 - Martínez, J.L., Sánchez-Elsner, T., Morcillo, G., and Díez, J.L. (2001) Heat shock regulatory elements are present in telomeric repeats of *Chironomus thummi*. *Nucleic Acid Res.* 29, No 22, 4760-4766.
-

Evolución de los Mecanismos de Determinación Sexual en Insectos

Evolution of Sex Determining Mechanisms in Insects

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

M^a FERNANDA RUIZ LORENZO
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

ESTHER SERNA SANZ
B. Predoctoral / Graduate Student

DOLORES MATEOS MOYA
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: *Sciara*, Determinación sexual, Compensación de dosis, *Drosophila*, Disco genital

Keywords: *Sciara*, Sex determination, Dosage compensation, *Drosophila*, Genital disc

Desarrollo del disco genital de *Drosophila*

Development of the Drosophila genital disc

En ambos sexos, el disco genital de *Drosophila* contiene el primordio genital de hembra y el primordio genital de macho. El gen *doublesex* controla cual de estos dos primordios se desarrolla y cual permanece reprimido. En hembras, la presencia del producto *DoublesexF* determina que el primordio genital que se desarrolle sea el de hembra mientras que el primordio genital de macho queda reprimido. En machos, la presencia del producto *DoublesexM* determina que el primordio genital que se desarrolle sea el de macho mientras que el primordio genital de hembra queda reprimido. Hemos demostrado que el desarrollo sexual del disco genital se debe a que *DoublesexF* previene la inducción del gen *decapentaplegic* por *Hedgehog* en el primordio genital del macho, mientras que *DoublesexM* bloquea la ruta de señalización de *Wingless* en el primordio genital de hembra. Además, *DoublesexF* es continuamente requerido durante el desarrollo larvario de la hembra para impedir la activación de *decapentaplegic* en el primordio genital de macho reprimido, y durante la metamorfosis para la citodiferenciación del disco genital de hembra. En machos, por el contrario, el producto *DoublesexM* parece no ser requerido durante el desarrollo lar-

In both sexes, the Drosophila genital disc contains the female and male genital primordia. The sex determination gene doublesex controls which of these primordia will develop and which will be repressed. In females, the presence of DoublesexF product results in the development of the female genital primordium and repression of the male primordium. In males, the presence of DoublesexM product results in the development and repression of the male and female genital primordia respectively. We have shown that DoublesexF prevents the induction of decapentaplegic by Hedgehog in the repressed male primordium of female genital discs, whereas DoublesexM blocks the Wingless pathway in the repressed female primordium of male genital discs. Furthermore DoublesexF is continuously required during female larval development to prevent activation of decapentaplegic in the repressed male primordium, and during pupation for female genital cytodifferentiation. In males, however, it seems that DoublesexM is not continuously required during larval development for blocking the Wingless signaling pathway in the female genital primordium. Finally, DoublesexM does not appear to be needed during pupation for male genital cytodiffe-

vario para conseguir el bloqueo de la señalización de Wingless en el primordio genital de hembra reprimido, al igual que no es requerido para la citodiferenciación del disco genital de macho durante la metamorfosis. Utilizando el gen *dachshund*, un gen diana de Decapentaplegic y de Wingless, se ha podido demostrar que DoublesexF y DoublesexM actúan de forma positiva y negativa controlando la respuesta a estos morfógenos en los primordios genitales de macho y hembra del disco genital. Hemos propuesto un modelo para entender el control del desarrollo del disco genital en el que los productos DoublesexF y DoublesexM manifiestan un papel positivo y negativo. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con el grupo de I. Guerrero, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-Universidad Autónoma, Madrid.

Desarrollo sexual de *Drosophila*

Las glándulas accesorias del macho (paragonias) de *Drosophila* son un par de órganos los cuales producen el fluido seminal, una secreción involucrada en el almacenamiento de los espermatozoides y en su posterior utilización por la hembra. Hemos identificado el primer gen ligado al cromosoma X, male-female-sterile in region 6E [*mfs(1)6E*], cuya función es requerida para la producción de fluido seminal normal. Los machos mutantes producen espermatozoides móviles, los cuales son transferidos a la hembra durante la cópula, pero no son almacenados en las espermatecas ni en el receptáculo seminal de la hembra. La esterilidad de los machos mutantes está causada fundamentalmente por la falta acusada de transferencia del fluido seminal a la hembra. Además, el fluido seminal mutante parece ser defectivo en la respuesta (receptividad reducida de la hembra a posteriores cópulas) y en los cambios fisiológicos (estimulación de la oogénesis) que experimenta la hembra después de la cópula. Las paragonias mutantes muestran anomalías morfológicas, relacionadas con su secreción glandular así como cambios cualitativos y cuantitativos en su contenido proteico.

Análisis formal de sistemas genéticos de desarrollo

Hemos llevado a cabo el análisis formal del sistema genético formado por los genes gap involucrados en controlar la segmentación en *Drosophila*. Los genes gap se expresan en dominios definidos a lo largo del eje anterior-posterior del embrión,

rentiation. Using dachshund as a gene target for Decapentaplegic and Wingless signals, it was also found that DoublesexM and DoublesexF positively and negatively control the response to these signals in male and female genitalia. A model was developed for the dimorphic sexual development of the genital primordium in which both DoublesexM and DoublesexF products play positive and negative roles. This work was done in collaboration with the group of I. Guerrero, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-Universidad Autónoma, Madrid.

Sexual development of *Drosophila*

*The Drosophila male accessory glands (paragonias) are two male-specific organs that produce seminal fluid, a secretion involved in sperm storage and subsequent sperm-utilization by the female. We have identified the first X-linked locus, male-female-sterile in region 6E [*mfs(1)6E*], required for the production of normal seminal fluid. Mutant males produce motile spermatozoa, which are transferred to females during mating, but which are not stored. Sterility of these males is mainly due to severe affected transfer of seminal fluid to females during mating. In addition, the mutant seminal fluid seems defective in triggering the behavioral (reduced receptivity to further mating) and physiological (increased egg-laying) changes normally observed in mated females. Mutant male accessory glands show notable abnormalities, connected with glandular secretion as well as qualitative and quantitative differences in their protein content.*

Formal analyses of developmental gene systems

We have performed the formal analysis of the gap gene network involved in Drosophila segmentation. The gap genes are expressed in defined domains along the anterior-posterior axis of the embryo, as a response to asymmetric maternal information in the oocyte. Though many of the individual interactions among maternal and gap genes are reasonably well understood, we still lack a thorough understanding of the dynamic behavior of the system as a whole. Based on a generalized logical formalization, the present analysis leads to the delineation of: (1) the minimal number of distinct, qualitative, functional levels associated with each of the key regulatory factors (the three mater-

como respuesta a la información materna asimétrica depositada en el oocito. Aunque las interacciones entre genes gap y entre éstos y los productos maternos están bien conocidas, poco se conoce sobre la dinámica del sistema gap como una entidad. Usando la metodología de la "lógica generalizada", hemos desarrollado un modelo sobre la función de dicho sistema gap, obteniéndose los siguientes resultados. (1) Se ha determinado el mínimo número de distintos estados funcionales de cada uno de los genes gap (gt, hb, Kr y kni) así como de los tres productos maternos Bcd, Hb y Cad. (2) Se han identificado las interacciones más cruciales y los circuitos de regulación. (3) Se han ordenado las diferentes interacciones génicas correspondientes a cada uno de los productos maternos y productos Gap de acuerdo con una escala de concentraciones umbrales funcionales de esos productos. Y (4) se ha identificado el papel de las interacciones cruzadas entre los genes gap en la transformación de la información posicional materna gradual en los dominios discretos de expresión de los genes gap. El modelo desarrollado explica la formación de los dominios de expresión de los genes gap que han sido experimentalmente identificados y, además, propone predicciones sobre el patrón de expresión de estos genes en situaciones de mutaciones en sólo uno de los genes y en situaciones de combinaciones de mutaciones en distintos genes. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con D. Thieffry de la Université de la Méditerranée, Marseille, France.

El modelo *Sciara*

La determinación sexual es un proceso de desarrollo que da lugar a hembras y machos, que son distintos desde el punto de vista morfológico, fisiológico y de conducta. Hay una plétora de mecanismos de determinación sexual. No obstante, estos mecanismos se pueden englobar en tres tipos básicos, dependiendo del origen de la señal primaria que determina el sexo: (i) la señal puede estar constituida por las diferencias cromosómicas del cigoto en los dos sexos, (ii) por el genotipo de la madre, a través de un factor materno depositado en el oocito, y (iii) por las condiciones ambientales. Los objetivos de nuestro grupo se encuadran dentro del objetivo general del conocimiento de la evolución de los mecanismos de determinación sexual. Como modelo experimental utilizamos *Sciara* (Orden Diptera, Suborden Nematocera), dado que en este insecto el desarrollo sexual es la consecuencia de una concatenación de los tres tipos básicos de

nal Bcd, Hb and Cad products, and the four gap Gt, Hb, Kr and Kni products), (2) the most crucial interactions and regulatory circuits of the earliest stages of the segmentation process, (3) the ordering of different regulatory interactions governed by each of these products according to corresponding concentration scales, and (4) the role of gap-gene cross-interactions in the transformation of graded maternal information into discrete gap-gene expression domains. Not only does the proposed model allow qualitative reproduction of the patterns of gene expression experimentally characterized, but also the simulation and prediction of single and multiple mutant phenotypes. This work was done in collaboration with D. Thieffry at the Université de la Méditerranée, Marseille, France

The Sciara model

*Sex determination is the developmental process that gives rise to males and females, which are distinct from the morphological, physiological and behavioral point of view. There exist a plethora of mechanisms determining gender. Notwithstanding, these mechanisms can be classified into three main classes following the origin of the first primary signal determining sex. Firstly, the signal can be made by the different chromosome constitution of the zygote in both sexes. Secondly, sex can be determined by the genotype of the mother, through a maternal factor deposited in the oocyte during oogenesis. Finally, sex can be determined by environmental conditions. The general goal of our group is the understanding of the evolution of sex determination mechanisms. *Sciara* (Diptera Order, Nematocera Suborder) is being used as experimental model, because in this insect the signal determining sex can be a concatenation of the three basic classes of sex determination mechanisms. The following questions are posed: (i), which are the *Sciara* genes, involved in controlling sexual development? (ii) are the *Sciara* genes homologous to the *Drosophila* sex determination genes involved also in controlling sex in *Sciara*, and (iii) how was the molecular evolution of the genes determining sex?*

señal que determina el sexo. Se formulan las siguientes preguntas: (i) ¿Cuáles son los genes de *Sciara* involucrados en controlar la determinación sexual?, (ii) ¿Los genes de *Sciara* homólogos de los genes que controlan la determinación sexual en *Drosophila* están también implicados en controlar la determinación sexual en *Sciara*?, y (iii) ¿Cómo ha sido la evolución molecular de los genes implicados en controlar el desarrollo sexual?

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB98-0466 (2000-2002)
- CAM, 08.6/0044/2001.1 (Junio 2002-Mayo 2004) (June 2002-May 2004)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- López, P.P., Santarén, J.F., Ruiz, M.F., Esponda, P., and Sánchez, L. (2001) The *Drosophila melanogaster* X-linked *mfs(1)6E* locus is required for production of normal seminal fluid by the male accessory glands. *Exp. Cell Res.* 267, 1-12.
- Sánchez, L., and Guerrero, I. (2001) The development of the *Drosophila* genital disc. *BioEssays* 23, 698-707.
- Sánchez, L., and Thioffry, D. (2001) A logical analysis of the *Drosophila* gap gene system. *J. Theor. Biol.* 211, 115-141.
- Sánchez, L., Gorfinkiel, N., and Guerrero, I. (2001) Sex determination genes control the development of the *Drosophila* genital disc modulating the response to Hedgehog, Wingless, and Decapentaplegic signals. *Development* 128, 1033-1043.
- Goday, C., and Ruiz, M.F. (2002) Differential acetylation of histone H3 and H4 in paternal and maternal germline chromosomes during development of sciarid flies. *J. Cell Sci.* 23, 698-707.
- Pérez-Sánchez, C., Casas-Tinto, S., Sánchez, L., Rey-Campos, J., and Granadino, B. (2002) *DmFoxF*, a novel *Drosophila* fork head factor expressed in visceral mesoderm. *Mech. Devel.* 111, 163-166.
- Paz, M., Ruiz, M.F., Sánchez, L., and Mikhailov, C. (2002) Identification of a fibronectin-like molecule from a marine bivalve *Pecten maximus* L., (1758) and its hyperaccumulation in the female compartment of the gonad. *Bol. Inst. Esp. Oceanogrph.* 18, 295-305.

Contribuciones a Libros/Contributions to books

- Thioffry, D., and Sánchez, L. (2002) Alternative epigenetic states understood in terms of specific regulatory structures. In "From Epigenesis to Epigenetics. The Genome in Context", L. Van Speybroeck., G. Van de Vijver and D. De Waele, Eds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 981, 135-153.
-

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

OMAR TRIANA CHÁVEZ (VII-VIII-2001)
Investigador visitante / Visiting Scientist

PEDRO PABLO LÓPEZ CASAS
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

EMILIO GONZÁLEZ GONZÁLEZ (Desde IX 2002)
JUAN C. ORTEGA LÁZARO
B. Predoctorales / Graduate Students

FERNANDO ESCOLAR ANTUNEZ
Personal Técnico / Technician



Palabras clave: Gametogénesis, Espermatogénesis, Expresión Génica, Infertilidad, Disruptores Endocrinos, Reprotoxicidad

Expresión y regulación génica en la gametogénesis de mamíferos

Se ha proseguido en el análisis de la expresión y regulación de distintos genes implicados en la gametogénesis. En este sentido, *Rnf19* es un gen miembro de la familia de “RING-fingers”, clonado y caracterizado en nuestro laboratorio, que ha sido asociado recientemente con el gen humano denominado “dorfin”. *Rnf19 (Xybp)* al igual que el homólogo humano, codifica para una proteína ubiquitin-ligasa E3 implicada en mecanismos de degradación proteica, con localización en centrosomas y en el bivalente XY de células paquiténicas. Se esta caracterizando su región reguladora y la posible participación de sus elementos en la espermatogénesis.

Ilf2 es un gen regulado durante meiosis y con expresión acumulada en espermatoцитos paquiténicos. Su producto génico se

Keywords: Gametogenesis, Spermatogenesis, Gene Expression, Infertility, Endocrine Disruptors, Reprotoxicity

Gene expression and regulation in mammalian gametogenesis

Our work continues on the analysis of expression and regulation of different genes involved in gametogenesis. In this sense, Rnf19 is a gene of the family of RING fingers, cloned and characterised in our laboratory, which has been associated with the human homologue called “dorfin”. Rnf19 (Xybp) as well as dorfin, code for a E3 ubiquitin-ligase involved in mechanisms of protein degradation, with a localisation in centrosomes and XY bivalent of pachytene cells. We have characterised its regulatory region and the putative participation of the regulatory elements in the spermatogenesis.

ILF2 is a gene regulated during meiosis with a transcript accumulation in pachytene spermatocytes. The gene product is associated to transcriptionally active chromatin. ILF2 is also

asocia a cromatina activa transcripcionalmente. ILF2 se asocia con otras proteínas de la misma familia formando complejos activadores de la transcripción. Su homólogo humano solamente difiere en un aminoácido y tiene expresión en distintos tipos celulares siempre asociado a actividad transcripcional.

Hemos continuado el estudio de la expresión en espermatogénesis de la proteína-fosfatasa PP2A. Más específicamente el gen correspondiente a su subunidad reguladora: B56delta. Se está analizando la expresión de esta y otras subunidades alternativas, en relación con la expresión de un gen específico de testículo: Mea (Male enhanced antigen) con transcripción inversa a PP2A-B56. Se han clonado nuevos transcritos de PP2A con posibilidad de ser responsables de la presencia de una subunidad reguladora de la proteína-fosfatasa en ausencia de B56 δ , cuando esta última es bloqueada por la expresión de Mea.

Ran-GTPasa está implicada en múltiples procesos esenciales en la viabilidad celular. Su expresión está regulada durante el desarrollo con alto nivel de acumulación en hematopoyesis y espermatogénesis. Recientemente, hemos definido la expresión regulada de las dos isoformas conocidas de Ran-GTPasa: M1 y M2. La forma M2 se ha caracterizado como específica de testículo. Ambas isoformas tienen expresión preponderante y paralela en células germinales del epitelio seminífero.

Flotilina es una proteína localizada en dominios lipídicos específicos de membrana ("lipid rafts") Hemos detectado la expresión de *Flo1* en células de Sertoli y su posible papel en la interacción intercelular. Se ha caracterizado la región reguladora de su expresión.

Infertilidad masculina, desregulación génica y reprotoxicidad

Alteraciones de la expresión génica específica pueden ser origen de disfunciones en el desarrollo de la gametogénesis y condicionantes de patologías asociadas a subfertilidad o infertilidad masculina. Se han iniciado dos nuevos proyectos, con la participación de empresas de Biotecnología, con la finalidad de definir genes marcadores implicados en tales situaciones. Tanto en humanos como en modelos animales, se están generando metodologías de análisis diferencial de la expresión génica en células gametogénicas. Genotecas de cDNA y análisis comparativos en situaciones normales y patológicas en humanos o en ratones con infertilidad inducida, posibilitarán el clonaje y

associated with other proteins of the same family generating transcription activator complexes. The human homologue only differs in one aminoacid and is expressed in different cell types, always associated to transcription.

We are continuing the study of the expression of the PP2A protein-phosphatase during spermatogenesis. More specifically, the gene corresponding to the regulatory subunit B56delta. We are analysing the expression of this and other alternative subunits in relation to the expression of a testis specific gene: Mea (Male enhanced antigen), which has inverted transcription orientation to PP2A-B56. We have cloned new transcripts for PP2A potentially involved in the regulation of the protein-phosphatase in absence of B56 δ , when the expression of B56 δ is blocked by the expression of Mea.

Ran-GTPase is involved in processes that are essential for cell viability. The expression is regulated during development with a high transcript accumulation in spermatogenesis and haematopoietic tissues. Recently, we have defined the regulated expression of the two known isoforms: M1 and M2. The M2 isoform is characterized as testis specific. Both forms have preponderant and parallel expression in the germ cells of the seminiferous epithelium.

Flotillin is a protein localised in lipid domains of the membrane (lip rafts). We have detected the expression of flotillin (Flo1) in Sertoli cells and its potential role in cell-cell interaction. The regulatory region of this gene has also been characterised.

Male infertility, gene deregulation and reprotoxicity

The alterations of specific gene expression can be the origin of disfunction in the gametic development and consequently induce pathologies associated to subfertility or infertility in males. We have initiated two new project, with the participation of Biotechnology companies, with the aim to select marker genes involved in infertility. Both in humans and animal models, we are generating methodologies of differential screening of gene expression in gametogenic cells. cDNA libraries and comparative analysis in normal and pathologic situations, both in humans and mice, might allow the characterisation of candidate genes. Different cell types from the seminiferous epithelium as well as primordial germ cells (PGCs), will be treated both in vivo and in vitro with compounds with endocrine disruption

caracterización de genes candidatos. Asimismo, diferentes tipos celulares del epitelio seminífero y células germinales primordiales (PGCs) serán tratados tanto *in vivo* como *in vitro* con compuestos con actividad de disrupción endocrina. La búsqueda de marcadores de expresión génica en células germinales expuestas a disruptores endocrinos es un proyecto financiado por la CE, continuación de otro anterior en el que hemos clonado más de 150 genes con desregulación de su expresión. Estos genes clonados más aquellos que se pretende aislar en estos proyectos serán objeto de generación de microarrays de DNA y usados en tests tanto de reprotoxicidad como de infertilidad

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

Nuestro grupo continúa prestando apoyo metodológico y colaboración en proyectos de caracterización genética y molecular de organismos biodegradantes y protozoos parásitos. Especialmente en el análisis de la expresión genética diferencial en *Trypanosoma* frente a compuestos de actividad parasitocida.

activity. The search of markers for gene expression in germ cells exposed to endocrine disruptors is a project granted by the EC that follows a previous one in which we have cloned more than 150 genes showing deregulation. These cloned genes in addition to those that we pretend to characterise in this new projects will be used in the creation of specific DNA microarrays for tests of reprotoxicity and infertility.

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

*Our group continues giving methodological support and collaborations to projects involved in molecular and genetic characterisation of biodegrading organisms and parasitic protozoa. Mainly, in the analysis of differential gene expression in *Trypanosoma* treated with compounds with parasitocidal activity.*

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, AMB1999-1785-E (2000-2001)
- CE, EVK4-CT-1999-00061(2000-2002)
- CICYT, BMC2000-1127 (2000-2003)
- PROFIT , (FIT-010000-2001-86), (FIT-010000-2002-43)
- CE, (QLK4-CT-2002-02403) (2002-2005)

Publicaciones/Publications

- García-Díaz, M., Domínguez, O., López-Fernández, L.A., Lain, M., Saniger, M.L., Ruiz, J.F., Párraga, M., García-Ortiz, M.J., Kirchhoff, T., del Mazo, J., Bernard, A., and Blanco, L. (2001) DNA polymerase lambda (pol λ a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J. Mol. Biol.* 301, 851-867.
- Granadino, B., Arias de la Fuente, C. Pérez-Sánchez, C., Párraga, M., López- Fernández, L.A., del Mazo, J., and Rey-Campos, J. (2001) Fhx (Foxj2) expression is activated during spermatogenesis and very early in embryonic development. *Mech. Devel.* 9, 157-160.
- López- Fernández, L.A., Párraga, M., del Mazo, J. (2002) If2 is regulated during meiosis and associated to transcriptionally active chromatin. *Mech. Devel.* 111, 153-157.
- López-Casas, P.P., López-Fernández, L.A., Krimer, D.B., and del Mazo, J. (2002) Ran GTPase expression during early development of the mouse embryo. *Mech. Devel.* 113, 103-106.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Bonilla E., and del Mazo, J. Dereglulation of gene expression in fetal oocytes exposed to doxorubicin. *Biochem. Pharmacol.* (en prensa/in press)
 - López-Casas, P.P., López-Fernández, L.A., Párraga, M, Krimer, D.B., and del Mazo, J Expression pattern of Ran-GTPase in mouse testis. *Developmental regulation of expression for RAN/M1 and RAN/M2 isoforms.* *Int. J. Devel. Biol.* (en prensa/in press)
 - Vanegas, N., García-Sacristán, A., López-Fernández, L.A., Párraga, M., del Mazo, J., Hernández, P., Schwartzman, J.B., and Krimer, D.B. Differential expression of Ran GTPase during HMBA-induced differentiation in murine erythroleukemia cells. *Leukemia Res.* (en prensa/in press)
-

Biología de la Reproducción *Biology of Reproduction*

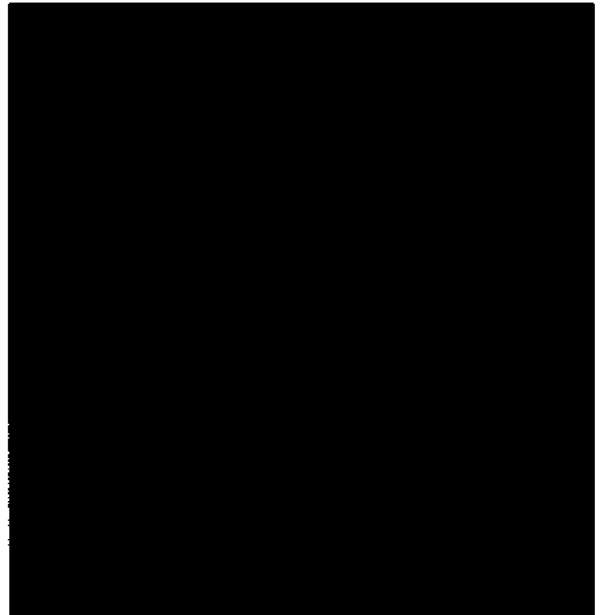
PEDRO ESPONDA FERNÁNDEZ
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ROSA CARBALLADA DÍAZ (Hasta V/2002)
Doctora vinculada / Associated Scientist

HUGO DÍAZ MURILLO
MARCO JARA GONZÁLEZ (Hasta V/2002)
B.Predoctorales / Graduate Students

ASCENSIÓN GONZÁLEZ DÍAZ
Personal Técnico / Technician

Figura: Larva trocófora del mejillón *Mytilus galloprovincialis* obtenida mediante una fecundación realizada mediante gametos transfectados con el gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) En azul se observan los núcleos, mientras el verde revela la expresión del gen de la GFP, como una proteína verde fluorescente en el citoplasma.



Palabras clave: Apoptosis, Epidídimo, Espermatozoides, Transfección, Vaso deferente

Keywords: Apoptosis, Epididymis, Transfection, Spermatozoa, Vas deferens

Transfección *in vivo* del tracto reproductor masculino de mamíferos

In vivo transfection of the male genital tract of mammals

Se ha descrito un procedimiento que permite transfectar *in vivo* las células epiteliales que tapizan el vaso deferente del ratón. Para ello se utilizaron diversas construcciones génicas (β -galactosidasa y Proteína Verde Fluorescente (GFP), que se acomplejaron a Liposomas y fueron introducidas mediante una microinyección en el vaso deferente. La expresión de los transgenes inyectados ocurrió exclusivamente en las células epiteliales a lo largo de todo el vaso y se observó en el 13.3% de ellas. La expresión del transgen se mantuvo en algunas células por espacio de hasta tres meses. Cuando se emplearon construcciones génicas (pSEAP control o pGFP-Ctk-37), que se expresan como una secreción, se constató que los fluidos originados por los vasos transfectados aparecían modificados. Por ello se concluyó que también era posible modificar el producto de secreción de las células epiteliales, lo cual implica la posibilidad de modificar la fertilidad de los espermatozoides. Actualmente, analizamos este fenómeno en el vaso deferente humano utilizando procedimientos de transfección *in vitro*.

Transfection of the mouse vas deferens has been performed using in vivo injections of DNA/liposome complexes. Gene transfer was done using the reporter genes p-EGFP-C1 encoding Green Fluorescent Protein (GFP) and pCMV-nls/ β -galactosidase. Foreign gene expression occurred exclusively in the epithelial cells of the vas and reached a maximum of 13.3% of cells. Expression of the GFP gene appeared from one week up to three months. Using gene constructions that express secretory proteins (pSEAP-control, pGFP-Ctk-37), the modification of the vas fluid content was observed. This is an important fact regarding the fertile condition of spermatozoa. We are now analyzing the same phenomenon in the human vas deferens using an in vitro transfection procedure.

Producción de ratones transgénicos mediante el empleo de embriones transfectados

Generation of transgenic mouse by transfection of pronuclear embryos

Utilizando complejos ADN/Liposomas se transfectaron tanto oocitos como embriones de ratón. Los embriones de una célula fueron transfectados utilizando un plásmido que codifica para una β -galactosidasa de expresión nuclear. Los embriones, una vez transferidos a madres receptoras, originaron un 1.27% de transgénicos. Estos transgénicos expresaron la enzima sólo en ciertos tejidos (cerebro, cerebelo, útero y testículo), mostrándose así como quimeras. Sin embargo, ninguno de los transgénicos obtenidos mostró expresión en las células germinales ni fue capaz de transmitir el transgen a sus hijos. En la actualidad se intenta mejorar la integración y la expresión del transgen empleando métodos recientemente descritos.

Using ADN/Lipids complexes mouse oocytes and one cell embryos were transfected. Pronuclear embryos were transfected using a gene construction which encodes for a nuclear form of β -Galactosidase. Transgene expression was observed from four cell embryos to blastocysts. Transfected embryos were transferred to pseudopregnant foster mothers, and then the 1.27% of the offsprings were transgenic. Transgenics expressed the enzyme in several organs, but none of them displayed expression in the germ cells or transmitted the transgene. We are currently testing some methods that favour early integration and homogeneous expression of the transgene.

Analysis of apoptosis in the epididymal epithelial cells

We have analyzed the influence of different factors on apoptosis induction in the epididymis of different mammals. Temperature increase (5-7 °C) is a factor that induces apoptosis. When the epididymis is reflected to the abdomen by means of a

Factores que provocan apoptosis en células epiteliales del epidídimo

Se ha estudiado la influencia de diversos factores en la inducción de apoptosis en el epitelio del epidídimo de algunos mamíferos. Uno de los factores que inducen este fenómeno es la alta temperatura que se provoca cuando los epidídimos son extraídos del escroto y son llevados, mediante una operación quirúrgica, a la cavidad abdominal. Este aumento de temperatura (5-7 °C) produce un grado importante de apoptosis en la región proximal de la cauda epididimaria. Junto con este fenómeno se observó que ocurría también un aumento de los productos de los genes *bax* y *bcl-2*. Sin embargo, no se observó ninguna influencia de los andrógenos, ni de *p53* ni de las proteínas de stress (HSPs) En la actualidad analizamos la inducción de apoptosis en epidídimos por causas tales como la edad o la situación estacional. Todos estos factores, al igual que la temperatura, afectan la fertilidad del individuo.

Análisis de las glicoproteínas de la membrana plasmática de espermatozoides animales

Las glicoproteínas (GP) de la membrana plasmática del espermatozoide han sido analizadas fundamentalmente en mamíferos, y el papel que estas GP juegan en la fecundación, y por lo tanto en la fertilidad, es ampliamente reconocido. Sin embargo, la distribución y la función exacta de estas GP en espermatozoides de otros grupos animales son prácticamente desconocidas. Nosotros hemos comenzado a estudiar especies que poseen espermatozoides con grandes variaciones morfológicas. Por ejemplo, en los peces Teleósteos en que no existe acrosoma, las GP aparecen repartidas por toda la membrana, mientras en los Elasmobranquios en que si existe acrosoma (al igual que en mamíferos) las GP sólo aparecen cubriendo el acrosoma. Actualmente se analizan estas GP en *Lepidoptera* que presentan espermatozoides nucleados y anucleados, o en algunos Marsupiales donde la estructura del gameto es extraordinariamente particular.

*surgical procedure, apoptosis is induced in the proximal region of the cauda. Concomitantly, we detected a strong induction of the *bax* and *bcl-2* gene products. Nevertheless, no significant role of androgens, *p53* or heat shock proteins (HSPs) were observed. We are now studying the induction of apoptosis in old animals or in animals during the non-reproductive period. All these situations, as well as higher temperature, have a deleterious effect on fertility.*

Study of plasma membrane glycoproteins in animal spermatozoa

*Plasma membrane glycoproteins (GP) has been amply analyzed in mammalian spermatozoa, and the role of these GP in fertilization and fertility is well known. Nevertheless, the distribution and role of these GP in spermatozoa of other animals groups is poorly known. We are analyzing sperm membrane GP in species in which spermatozoa show morphophysiological particularities. In Teleostean fishes, in which sperm do not have an acrosome, GP appeared over all the sperm surface. But in Elasmobranchia, in which acrosome is present as occurs in birds and mammals, GP are exclusively over the acrosomal surface. We are currently studying sperm GP in some *Lepidoptera* which show sperm with nucleus and without nucleus, and also in some Marsupials that have a particular sperm anatomy.*

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CSIC-Universidad de Chile. Proyecto (2001-2002)
- DGICYT, BCM 2000-0899 (2001-2003)
- Pharmamar, Contrato (2002-2003)
- Cooperación Científica/Iberoamérica, Univ. Valparaíso (Chile) (2002-2004)

Tesis Doctorales/Doctoral Thesis

- Marco Jara González. Factores que inducen apoptosis en órganos del tracto genital masculino de mamíferos. Universidad Autónoma de Madrid, 2002. Directores: Drs. Rosa Carballada y Pedro Esponda

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Carballada, R., and Esponda, P. (2001) Regulation of foreign DNA uptake by mouse spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 262, 104-113.
 - López, P.P., Santarén, J.F., Ruiz, M.F., Esponda, P., and Sánchez, L. (2001) The *Drosophila melanogaster* X-linked *mfs(1)6E* Locus is required for production of normal seminal fluid by the male accessory glands. *Exp. Cell Res.* 267, 1-12.
 - Rojas, M.V., and Esponda, P. (2001) Plasma membrane glycoproteins during spermatogenesis and in spermatozoa of some fishes. *J. Submicroscopical Cytol. Pathol.* 33, 133-140.
 - Carballada, R., Reloso, M., and Esponda, P. (2002) Generation of transgenic mice by transfection of pronuclear embryos using lipid-DNA complexes. *Zygote* 10, 209-216.
 - Jara, M., Esponda, P., and Carballada, R. (2002) Abdominal temperature induces region-specific p53-independent apoptosis in the cauda epididymis of the mouse. *Biol. Reprod.* 67, 1189-1196.
 - Valenzuela, M., Reloso, M., and Esponda, P. (2002) In vivo transfection of the mouse vas deferens. *J. Exp. Zool.* 293, 532-540.
-

Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados

Growth Factors in Vertebrate Development

FLORA DE PABLO
Jefa de Grupo / Group Leader
ENRIQUE J. DE LA ROSA
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

CARLOS VICARIO ABEJÓN
CATALINA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ
Investigadores Contratados Programa
Ramón y Cajal /
Scientists Ramón y Cajal Program

ANA VALENCIANO
CARMEN SEGUNDO (Desde VII-2001)
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

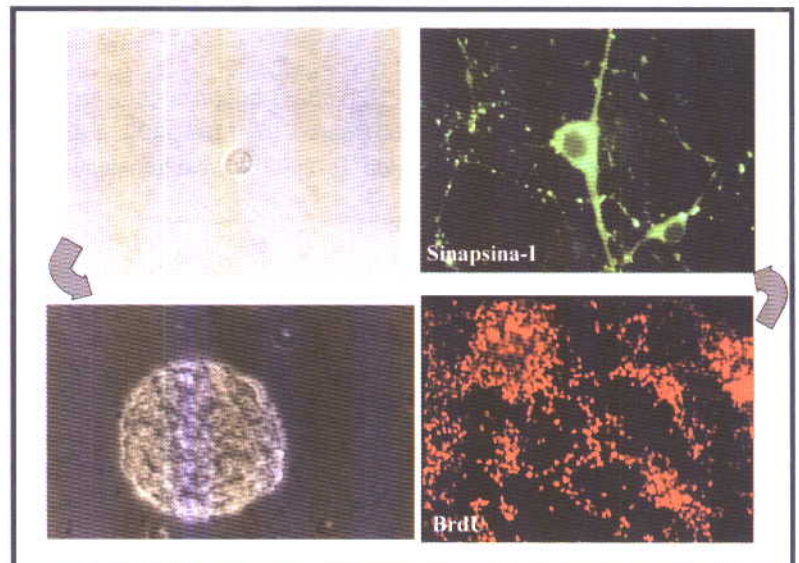
TERESA CHAVARRIA (Desde VII-2002)
SILVIA CORROCHANO (Desde VII-2001)
CARMEN FERNÁNDEZ MORENO
ALICIA MANSILLA
GAIZKA OTAEGI (Desde VII-2002)
M^aJOSÉ YUSTA
B. Predoctorales / Graduate Students

ISABEL ALVÁREZ (Desde XI-2001)
Personal Técnico / Technician



Figura: Diferenciación in vitro de células madre de bulbo olfatorio en neuronas maduras. (Carlos Vicario Abejón, María José Yusta Boyo, Flora de Pablo)

Figure: Differentiation of olfactory bulb stem cells in vitro into mature neurons



Palabras clave: Desarrollo, Apoptosis, Neurogénesis, Células madre, Gen de proinsulina

Keywords: Development, Apoptosis, Neurogenesis, Stem cells, Proinsulin gene

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

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

La insulina, en su forma precursora de proinsulina, se expresa en etapas muy tempranas del desarrollo, antes de que aparezca el páncreas. Nuestro grupo se ha centrado en caracterizar sus efectos como factor de crecimiento empleando modelos animales (pollo, ratón y líneas celulares) En el embrión de pollo prepancreático, durante la neurulación, y en la retina de ratón, la insulina ejerce una función antiapoptótica (ver apartado siguiente). Dada esta función como factor de crecimiento y supervivencia embrionario, distinta de su función hormonal clásica, y la falta de respuesta del RNA de la proinsulina prepancreática al estímulo de la glucosa, hemos abordado el estudio de su regulación génica con la hipótesis de que debía ser diferente a la regulación de la expresión pancreática. Efectivamente, los transcritos prepancreáticos presentan al menos 3 secuencias 5' no traducidas alternativas a la del mRNA pancreático que era el único descrito hasta el momento. Actualmente estamos estudiando la regulación de dichos transcritos alternativos, especialmente su regulación traduccional y de procesamiento alternativo.

Insulin, in its precursor form proinsulin, is expressed in very early stages of development, before the differentiation of the pancreas. Our group has focused in characterizing proinsulin/insulin effects as a growth factor, using animal models (chick, mouse and cell lines) In the prepancreatic chick embryo, during neurulation, insulin exerts an antiapoptotic function (see next paragraph). In view of this function as a growth/survival factor in embryogenesis, distinct from its classic hormonal function, we decided to approach the study of proinsulin gene regulation in the early embryo, with the hypothesis that it might be different from the pancreatic. Indeed, the prepancreatic transcripts contain at least two different 5' UTR sequences, alternative to the pancreatic insulin mRNA, the only described so far. Presently, we are studying the regulation of those alternative transcripts, specially its translational regulation and alternative splicing.

Caracterización de la muerte celular programada durante el desarrollo del sistema nervioso y en modelos neurodegenerativos de retina

Characterization of programmed cell death during neurogenesis and in retinal degeneration models

La muerte celular programada es un proceso clave, tanto en la fisiología del organismo como en numerosas patologías. Hemos caracterizando la incidencia y regulación de la apoptosis en etapas tempranas, poco estudiadas, del desarrollo del sistema nervioso en vertebrados, pollo y, más recientemente, ratón. La muerte celular programada es un proceso natural durante la neurulación y la neurogénesis temprana de la retina, que está atenuada tanto por factores de crecimiento extracelulares, la proinsulina arriba mencionada, como por factores intrínsecos celulares, entre otros la chaperona Hsc70, controlada a su vez por proinsulina. Actualmente estamos abordando las causas fisiológicas que a nivel celular determinan la susceptibilidad al proceso de muerte de ciertas poblaciones de precursores neurales.

Programmed cell death is a key process in organisms physiology and pathology. We have characterized the incidence and regulation of apoptosis in early, little studied, stages of nervous system development in vertebrates, the chicken and the mouse. Programmed cell death is a natural process during neurulation and early neurogenesis in retina that is attenuated by extracellular growth factors, such as proinsulin, and by intrinsic factors, such as the chaperone Hsc70, regulated by proinsulin itself. Presently, we are focused on the physiological causes that determine apoptosis susceptibility at the cell level in some neural precursors. Since proinsulin turned to be a potent antiapoptotic factor during development, capable of activating several parallel survival pathways, we have started exploring its possible therapeutical application in neurodegenerative diseases, in particular in the rd mice, a model system for retinitis pigmentosa.

Al haber resultado que la proinsulina es un potente factor antiapoptótico durante el desarrollo, capaz de activar varias vías paralelas de supervivencia, hemos recientemente iniciado el estudio de su posible aplicación terapéutica en patologías neurodegenerativas, en concreto en los ratones *rd* que sufren una distrofia hereditaria de la retina equivalente a la enfermedad humana de la retinosis pigmentaria.

Cooperación funcional de la citokina LIF y el IGF-I

La regulación precisa del desarrollo embrionario requiere la interacción de señales extrínsecas e intrínsecas celulares. Ambas, además, actúan en redes con funciones específicas, dependiendo del momento del desarrollo de las células implicadas y de las combinaciones de factores de crecimiento y diferenciación. Hemos abordado la posible cooperación funcional de IGF-I y LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) en un modelo de dobles ratones mutantes nulos. Dichos ratones mueren perinatalmente, lo que no pasa con los mutantes sencillos, poniendo en evidencia un sinergismo entre ambos factores en el control de funciones vitales. La histopatología del pulmón y el hueso de los mutantes nulos para IGF-I se encontró exacerbada en los dobles mutantes, con retrasos del desarrollo también apreciables en el músculo y la piel. Los factores de transcripción implicados en pulmón son TTF-1 y Sp3, ambos disminuidos en el doble mutante. La mayor parte del sistema nervioso central no presentaba defectos evidentes en los mutantes sencillos o dobles, con la excepción del bulbo olfatorio en los mutantes de IGF-I, que mostraba una severa pérdida de células mitrales y alteración de la glía radial. Estas observaciones ponen de manifiesto las diferentes relaciones de cooperación tejido-específicas entre ambos factores durante el desarrollo embrionario.

Células madre neurales y su modulación por factores de crecimiento

Las células madre son aquellas que, presentando capacidad de autorrenovación, mantienen su potencial de diferenciación a múltiples, sino a todos, los fenotipos celulares presentes en un organismo o tejido adultos. El estudio de las células madre es una línea de máxima actualidad por sus posibles aplicaciones terapéuticas. Pero dicho uso requerirá, muy posiblemente, un profundo conocimiento de su biología en condiciones de desa-

Functional cooperation of the cytokine LIF and IGF-I

The precise regulation of embryonic development requires the interaction of intrinsic and extrinsic cellular signals that act in networks with specific functions depending of the time in development, of the types of cells and of the combination of growth and differentiation factors present. We have analyzed the possible functional cooperation of IGF-I and LIF in a model of double null mutants. These mice die perinatally, in contrast with the single gene mutants, unraveling a synergism between both factors for the control of vital functions. The histopathological phenotype in the lung and bone was more marked in the double mutants with delayed development also found in the muscle and skin. The transcription factors implicated in the lung are Sp3 and TTF1. The vast majority of central nervous system areas had no phenotype in the single or double mutants, with the exception of the olfactory bulb in the IGF-I mutants, in which a severe loss of mitral cells and disorganization of radial glia was evident. These observations show the distinct tissue dependent relationships and functional cooperation of the two factors during development.

Neural Stem cells and their modulation by growth factors

Stem cells are defined as cells having the ability to self-renewal and the potential to differentiate in the multiple cell phenotypes present in an adult organism or tissue. Research on stem cells has a great relevance due to the potential therapeutic applications of these cells. However, their therapeutic use will first require a deep knowledge of stem cell biology during development. Our group has characterized highly proliferative stem cells from the mouse olfactory bulb that differentiate into the three types of neural cells, neurones, astrocytes and oligodendrocytes (see Figure) The knockout mice for IGF-I has diminished the formation of neurones, astrocytes and oligodendrocytes derived from olfactory bulb stem cells, indicating an essential role of this factor in neural differentiation.

rollo normal. Nuestro grupo ha aislado y caracterizado células madre neurales procedentes del bulbo olfatorio de ratón con alta capacidad de proliferación y que se diferencian a los principales tipos celulares presentes en el sistema nervioso, es decir, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (ver Figura). El ratón knockout para IGF-I tiene disminuída la formación de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos a partir de células madre de bulbo olfatorio, indicando el papel esencial de este factor en la diferenciación neural.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MCyT, PM97-0143 (1998-2001)
- MCyT, PM99-0094 (2000-2003)
- FIS, 01/0952 (2001-2003)
- CAM, 08.6/0030/2000 (2001-2002)
- CAM, 08.5/0019.1/2001 (2002-2004)
- MCyT, SAF2001-1038 (2002-2004)
- MCyT, BMC 2001-2132 (2002-2004)

Tesis Doctoral/Doctoral Thesis

- Carmen Fernández Moreno. Cooperación funcional entre los factores LIF e IGF-I en el desarrollo. Universidad Complutense de Madrid. Noviembre, 2002. Directores: Drs. Flora de Pablo y Jose G. Pichel.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Camarero, G., Avendaño, C., Fernández-Moreno, C., Villar, M.A., Contreras, J., De Pablo, F., Pichel, J.G., and Varela-Nieto, I. (2001) Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-I-deficient mice. *J. Neurosci.* 21, 7630-7641.
- Esteban, L.M., Vicario-Abejón, C., Fernández-Salguero, P., Fernández-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., López, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J.M., Pellicer, A., and Santos, E. (2001) Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1444-1452.

- Fernández, A.M., Kim, J.K., Yakar, S., Dupont, J., Hernández-Sánchez, C., Castle, A.L., Filmore, J., Shulman, G.I., and LeRoith, D. (2001) Functional inactivation of the igf-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev.* 15, 1926-1934.
- Hernández-Sánchez, C., Basile, A.S., Fedorova, I., Arima, H., Stannard, B., Fernández, A., Ito, Y. and LeRoith, D. (2001) Mice transgenically overexpressing sulfonylurea receptor 1 in forebrain resist seizure induction and excitotoxic neuron death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 3549-3554.
- Hernández-Sánchez, C., Rubio, E., Serna, J., De la Rosa, E.J., and De Pablo, F. (2002) Unprocessed proinsulin promotes cell survival during embryonic neurulation. *Diabetes* 51, 770-777.
- Rubio, E., Valenciano, A.I., Segundo, C., Sánchez, N., De Pablo, F., and De la Rosa, E.J. (2002) Programmed cell death in the neurulating embryo is prevented by the chaperone Hsc70. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1646-54. (Selected for "Highlight" en *Nature Rev. Neuroscience* 3, 489.
- Valenciano, I., Mayordomo, R., De la Rosa, E.J., and Hallböök, F. (2002) Biotin decreases retinal apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo. *Neuroreport* 13, 297-299.
- Vicario-Abejón, C., Owens, D., McKay, R., and Segal, M. (2002) Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nature Rev. Neuroscience* 3, 965-974.

Próximos artículos/Forthcoming articles

- Frago, L. M., Cañón, S., De la Rosa, E.J., León, Y., and Varela-Nieto, I. (2003) Programmed cell death in the developing inner ear is balanced by NGF and IGF-I. *J. Cell Sci.* 116, 475-486, (en prensa/in press)
- Pichel, J.G., Fernández-Moreno, C., Vicario-Abejón, C., Testillano, P.S., Patterson, P.H., and De Pablo, F. (2003) Developmental cooperation of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor I in mice is tissue-specific and essential for lung maturation involving Sp3 and TTF-1. *Mech Develop.* 120, 349-361, (en prensa/in press)
- Varela, C., Igartua, I., De la Rosa, E.J., and de la Villa, P. (2003) Functional modifications in rod bipolar cells in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Vis. Res.* (en prensa/in press)
- Varela-Nieto, I., De la Rosa, E.J., Valenciano, A.I., and León, Y. (2003) Cell death in the nervous system: Lessons from insulin and insulin-like growth factors. *Mol. Neurobiol.* (en prensa/in press)
- Vicario-Abejón, C., Yusta-Boyo, M.J., Fernández-Moreno, C., and De Pablo, F. (2003) Locally-born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related growth factors and require endogenous IGF-I for differentiation into neurons and glia. *J. Neurosci.* 23, 895-906, (en prensa/in press)

Artículos de divulgación/Press articles

- De Pablo, F. (2001) Las científicas y el techo de cristal. En: *Las mujeres ante la ciencia del siglo XXI*. Viky Fías Ruiz, Ed. Editorial Complutense. Madrid. Pgs. 173-181.
 - De Pablo, F. (2002) Biología y Biomedicina: un área de mujeres fértiles. En: *Ciencia y Tecnología en el CSIC: una visión de género*. ARBOR vol. 679-680, V. Fernández y M. J. Santemasas, Eds. Publicaciones del CSIC, Madrid. Pgs. 579-603.
-

Departamento de Biología de Plantas

Department of Plant Biology

Jefe de Departamento
Department Head

PEDRO CASTELLANO DOMÍNGUEZ (Hasta V-2002)
DIONISIO LÓPEZ LABELLA (Desde V-2002)

Profesores de Investigación

PEDRO CASTELLANO DOMÍNGUEZ
JOSÉ RAMÓN GARCÍA RUIZ
DIONISIO LÓPEZ LABELLA
M^ª CARMEN RIVERA ALMEIDA

Investigadores Científicos

M^ª ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ GÓMEZ
SUSANA MORENO DE LA ESPINA

Científicos Titulares

ISABEL GARCÍA LUQUE
JUAN JOSÉ LÓPEZ MOYA GÓMEZ
FCO. JAVIER MEDINA DIAZ
FELIX ORTEGO ALONSO
PILAR SÁNCHEZ TESTERANO
M^ª TERESA SANTA YCER

Personal Técnico

CARLOS ALMARAZ SANZ
MERCEDES CARNOTA ROMERO
SONIA CASTILLO LLUVA
NIEVES FORTUDEL CABAÑAS
MONSERRAT LORENTE DE MINGO
M^ª LUISA RUIZ SERRA

Secretaria

M^ª VICTORIA LAFITA TOGORES

Matriz Nuclear y Regulación de la Organización y Funcionalidad Nuclear

Nuclear Matrix and Regulation of the Nuclear Organisation and Function

SUSANA MORENO DÍAZ DE LA ESPINA

Jefe de Grupo / Group Leader:

MARÍA ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ GÓMEZ (Hasta VII-2002)

Investigadoras de Carrera / Staff Scientists

M^a JESÚS COCERO OVIEDO

OLGA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ (Desde V-2001/Hasta VI-2002)

Investigadoras Visitantes / Visiting Scientists

PING CUI (Hasta I-2002)

B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

ELSA ALVERCA

ADRIANA CERNA (Desde X-2002)

VERÓNICA DOMÍNGUEZ PLAZA

RAFAEL SAMANIEGO GARCÍA

B. Predoctorales / Graduate Students

PABLO GONZÁLEZ GARCÍA (Desde X-2001/Hasta VII-2002)

JUAN ANTONIO ARDURA RODRÍGUEZ (DESDE X-2002)

Estudiantes Licenciatura / Undergraduate Students

MERCEDES CARNOTA ROMERO

NIEVES FONTÚRBEL CABAÑAS (Hasta XI-2002)

Personal Técnico / Technicians

Palabras clave: Matriz nuclear, Proteínas, Factorías de replicación y splicing, Plantas, Dinoflagelados, Ciclo celular, Replicación, Organización cromosómica, Núcleo esqueleto, Transcripción y splicing, Embriones ovinos, Desarrollo preimplantacional *in vivo* e *in vitro*, Criopreservación, Ultraestructura

Microarquitectura del núcleo esqueleto y actividades asociadas

La matriz nuclear (MN) de plantas está constituida por una red anastomosada de filamentos de estructura periódica, que forman el núcleo esqueleto básico, y agregados multiproteicos de



Keywords: Nuclear matrix, Proteins, Replication and splicing factories, Plants, Dinoflagellates, Cell cycle, Replication, Chromosome organization, Nucleoskeleton, Transcription and splicing, Sheep embryos, *in vivo* and *in vitro* preimplantational development, Cryopreservation, Ultrastructure

The microarchitecture of the nucleoskeleton and attached activities

The plant nuclear matrix (NM) consists of a branched network of filaments with periodic structure, which forms the basic nucleoskeleton and multiprotein aggregates of variable sizes

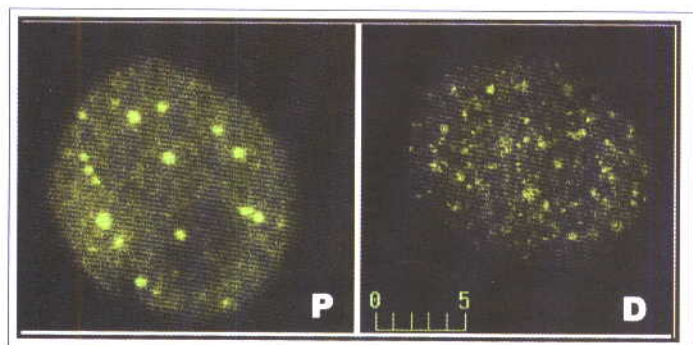


Figura 1: Imágenes de microscopía confocal de células meristemáticas radicales de cebolla en proliferación (P) y durmientes (D) incubadas con el anticuerpo Y12 que reconoce el epítipo de dimetil argininas simétricas (sDMA) de las proteínas Sm que forman el anillo heptamérico de las snRNPs, mostrando la distribución diferencial de los factores de splicing en ambos tipos celulares. Las células porliferantes tienen una distribución en equilibrio dinámico de los factores de splicing en dos dominios nucleares : 1) un extenso y delicado retículo nucleoplásmico, correspondiente al splicing co-transcripcional, y numerosos cuerpos de Cajal implicados en la maduración de las partículas de snRNP, ambos asociados a la matriz nuclear. En células durmientes, inactivas en transcripción, no existe esta red nucleoplásmica y las proteínas Sm se acumulan en numerosas micro-

estructuras, diferentes de los cuerpos de Cajal, que hemos demostrado que constituyen sitios de almacenamiento de factores de splicing, que permiten una rápida movilización durante la activación celular. (Cui, P and Moreno Díaz de la Espina, S. (2002) *Planta* 217 (DOI nº 10.1007/s00425-002-0966-3). Barra aumento = 5 µm en ambas imágenes.

*Figure 1: Confocal fluorescent images of steady-state proliferating (P) and dormant (D) onion meristematic cells incubated with the antibody Y12 that recognises the sDMA epitope present in the Sm proteins forming the heptamere ring of snRNPs, displaying the differential distribution of splicing factors in both cell types. Proliferating cells have a steady-state dynamic distribution of the splicing factors in two nuclear domains: 1) an extensive and delicate nucleoplasmic network corresponding to co-transcriptional splicing, and numerous Cajal bodies involved in snRNPs maturation, both associated to the nuclear matrix. In dormant nuclei; the nucleoplasmic network is absent. Instead, the Sm proteins accumulate in a myriad of micro-speckles, different from Cajal bodies, which serve as storage sites for frozen splicing factors, in the dormant nuclei, ready to be used very early after release from dormancy (D). (Cui, P and Moreno Díaz de la Espina, S. (2002) *Planta* 217 (DOI nº 10.1007/s00425-002-0966-3). Scale bar = 5 µm in both figures.*

tamaño variable correspondientes a los complejos multiméricos asociados. La MN interviene en el control de múltiples procesos nucleares como son el mantenimiento de la organización de la cromatina, expresión génica, replicación, etc. Actualmente estamos implicados en la caracterización de componentes proteínicos de esta estructura y en la investigación del papel de la MN en el control del patrón de replicación y en el ensamblaje y funcionalidad de factorías de replicación y *splicing*.

Hemos caracterizado el homólogo en plantas de NuMA, una proteína estructural de tipo *coiled-coil* del nucleoesqueleto y citoesqueleto de vertebrados, que sirve de puente entre los complejos de *splicing* y el nucleoesqueleto, y contribuye a la estabilización del huso mitótico a través de sus interacciones con el complejo multiproteico dineína/ dinactina. AcNuMA presenta tres isoformas de 210, 220 y 230 kD con diferente solubilidad,

corresponding to the attached multimeric complexes. The NM is involved in the control of many nuclear processes such as the maintenance of chromatin organization, gene expression, replication, etc. At present we are involved in the characterization of the protein components of this structure, and the investigation of the role of the nuclear matrix in the control of the replication program and in the assembly and function of the replication and splicing factories.

We have characterized in plants the homolog of NuMA, a structural coiled-coil protein of both the nucleoskeleton and cytoskeleton in vertebrates, which anchors the splicing complexes to the nucleoskeleton and also contributes to the mitotic spindle stabilization, through interaction with the multiprotein dynein/dynactin complex. AcNuMA has three isoforms of 210, 220 and 230 kD with different solubilities, that localize in the

localizadas en los filamentos del núcleoesqueleto interfásico y en la matriz del huso mitótico. Aunque el gen NuMA no está secuenciado en *Allium*, un ortólogo de NuMA, y la proteína asociada a NuMA GAS41 se han encontrado en *Arabidopsis*, demostrando la conservación evolutiva de los principales componentes del núcleoesqueleto y citoesqueleto (Moreno Díaz de la Espina, S and De la Torre C. In: *The Plant Cytoskeleton*. NATO Sciences Series A: Life Sciences. C Lloyd and Y Blume eds (in press).

Nuestro grupo ha caracterizado MFP1, otra proteína de tipo *coiled-coil* con capacidad de asociación a DNA conservada en plantas. Hemos demostrado que existen dos homólogos de AcMFP1 en células proliferantes que difieren en su movilidad electroforética, pI, solubilidad y localización nuclear. La isoforma de 80 kDa presenta un pI neutro (7,2) y no está asociada a la matriz nuclear. La asociada a matriz es la mayoritaria, tiene 90 kD, un pI muy básico (8,2-9,7) y 13 estados diferentes de fosforilación, que presentan diferentes solubilidades en urea y tampones de alta fuerza iónica (Samaniego, R., et al. *Planta* 212, 535-546. (2001). Su asociación a la matriz nuclear está regulada por caseína kinasa II, siendo las formas desfosforiladas las asociadas a matriz (Samaniego, R., et al. *Plant J*, submitted). AcMFP1-90 kD es una proteína constitutiva. AcMFP1 colocaliza con BrdU y PCNA en las factorías de replicación tardía asociadas a la MN, y se detecta mediante marcado de alta resolución en cuerpos nucleares relacionados con las mismas (Samaniego, R., et al. *Planta* 212, 535-546. (2001). El clonaje de AcMFP1 se ha intentado con una genoteca que contiene una mezcla de cDNAs de bulbo hoja y raíz, pero hasta el momento no hemos obtenido resultados positivos.

La replicación del genoma se produce en el ciclo celular siguiendo un orden estricto temporal y espacial. Tiene lugar en ensamblajes multiméricos conocidos como factorías de replicación (FR) ancladas a la matriz nuclear, y visibles como lugares de incorporación de precursores del DNA (5-Br-2'Udr). Dichas factorías derivan de complejos pre-replicativos. Las células en equilibrio proliferativo de *Allium cepa* muestran diferentes patrones de replicación. En poblaciones sincronizadas con HU, caracterizadas por citometría de flujo, hemos demostrado que existe una secuencia temporal y espacial de replicación del genoma en asociación a la MN (Samaniego, R., et al. *Planta* 215, 195-204, (2002). Nuestros resultados sugieren que la asociación de AcMFP1 a los complejos de la MN es pre-replicativa, aunque

filaments of the nucleoskeleton in interphase, and in the matrix of the mitotic spindle. NuMA gene is not yet sequenced in onion, but a NuMA ortholog and a NuMA-associated protein GAS-41 are present in Arabidopsis, demonstrating the evolutive conservation of the main nucleoskeletal and cytoskeletal components (Moreno Díaz de la Espina, S and De la Torre C. In: The Plant Cytoskeleton. NATO Monographs Series C Lloyd and Y Blume eds (in press).

*At present we are involved in the characterization of MFP1, another coiled-coil protein of the nuclear matrix with DNA-binding activity, conserved in plants. There are two AcMFP1 homologs in root proliferating cells, differing in electrophoretic mobility, pI, solubility and nuclear localization. The 90 kD-MFP1 is the most abundant. It is bound to the matrix, has a basic pI (8,2-9,7) and 13 different phosphorylation states, with different solubility in urea and high salt buffers (Samaniego, R., et al. *Planta* 212, 535-546. (2001) and its association to nuclear matrix is regulated by casein kinase II (Samaniego et al., *Plant J*, submitted). 90 kD-MFP1 is a constitutive protein. AcMFP1 co-localizes with BrdU and PCNA in the late replication factories associated to the nuclear matrix, and was detected by immunogold-labelling in nuclear bodies related to them. We are trying the cloning of AcMFP1 with an onion library containing cDNAs from bulb, leaf and root, but we don't have positive results yet.*

*DNA replication in eukaryotes takes place during the S period of the cell cycle in multimeric assemblies called replication factories (RF), visible by immunodetection of 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation, following a strict temporal and spatial sequence. The RFs are anchored to the NM and are derived from pre-replicative complexes. Distinct topological patterns of replication are displayed in *Allium cepa* L. root meristems proliferating under steady state kinetics, with RFs anchored to the NM. In cells synchronized by HU treatment, characterized by flow cytometry, we have demonstrated that there is a temporal and spatial sequential organization of genome replication, with distinct patterns for early (S1) and late (S3) replication (Samaniego, R., et al. *Planta* 215, 195-204, (2002). Our results suggest that the association of AcMFP1 to the complexes in the NM is pre-replicative, although a possible involvement in post-replication DNA repair or in DNA maturation is under investigation.*

Nuclear RNA metabolism is also spatially ordered in the nucleus by association to the NM, with a dynamic distribution

una posible implicación en reparación post-replicativa o maduración del DNA está también en estudio.

El metabolismo del RNA está también organizado espacialmente en asociación al núcleoesqueleto, con una distribución dinámica, completamente distinta de la de las FRs. La inmunofluorescencia con anticuerpos contra distintos componentes del spliceosoma demuestra que no sólo la distribución topológica, sino también la composición proteínica de los sitios de splicing es dependiente de la actividad nuclear (Figura 1, Cui, P and Moreno Díaz de la Espina, S. (2002).

Organización nuclear en Dinoflagelados

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

Hemos demostrado la existencia de una matriz nuclear eucariota compleja en Dinoflagelados, con una organización estructural similar a la de vertebrados y plantas. La detección de proteínas que intervienen en la organización de dominios funcionales y estructurales del DNA como las laminas y topoisomerasa II, así como la capacidad de sus proteínas para asociar secuencias MAR heterólogas, indican que el DNA no nucleosómico de Dinoflagelados tendría una organización en lazos de tipo eucariota, demostrando que la organización de la expresión génica en dominios discretos es una adquisición antigua del núcleo eucariota y reafirman la posición taxonómica plenamente eucariota del phylum.

Actualmente estamos investigando el período de replicación durante la fase de crecimiento exponencial de los cultivos, en varias especies con distinta carga de DNA y posición taxonómica, mediante citometría de flujo. Para cada uno de ellas se analiza la duración, posición en el ciclo celular y patrón de replicación del DNA. Nuestros resultados demuestran que a pesar de la alta carga de DNA de estos organismos y de la carencia de histonas, el período S es relativamente corto en relación a la dura-

different from that of the RFs. Immunofluorescence with antibodies against components of the spliceosome, reveals that not only the topological distribution, but also the protein composition of the splicing sites depend on nuclear activity (Figure 1; Cui and Moreno Díaz de la Espina, 2002).

Nuclear Organization in Dinoflagellates

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

We have demonstrated the existence of a complex eukaryotic nuclear matrix in Dinoflagellates, with a similar organization to those of plants and vertebrates, although with slight structural variations correlating with the peculiarities of the nuclear organization in this phylum. The detection of proteins involved in the organization of the functional and structural DNA domains, such as lamins and topoisomerase II, as well as the MAR binding ability demonstrated by the matrices in vitro, indicate that the non-nucleosomic DNA of Dinoflagellates would be organised in eukaryotic loop domains. Our results demonstrate that the organization of the gene expression in domains is an old acquisition of the eukaryotic nucleus, and reinforce the eukaryotic position of Dinoflagellates.

At present we are investigating the replication phase during exponential growth of the cultures, in several Dinoflagellates species with different DNA charge and taxonomic position, by flow cytometry. For each one we analyze the duration, relative position in cell cycle, and topological replication sequence of their DNA. Our results demonstrate that in spite of the high DNA charge and the lack of histones, the S phase is relatively short in relation to the whole cell cycle, and also that the cultures become synchronous by the photoperiod, which will allow us a detailed analysis of the corresponding subperiods of S phase, and also to determine if there is an ordered temporal and spa-

ción del ciclo celular. En ellos se produce una sincronización por efecto del fotoperíodo, lo cual nos va a permitir analizar más detalladamente cada uno de los subperíodos y determinar si existe en Dinoflagelados una secuencia de replicación temporal y espacialmente ordenada tanto de familias de genes como del DNA no informativo. Estamos trabajando en la caracterización de las factorías de replicación mediante inmunofluorescencia, que permitirá resolver el enigma de cómo replica este DNA no nucleosómico organizado en cromosomas permanentemente condensados durante el ciclo celular. Para ello estamos tratando de encontrar un método de marcado alternativo al de incorporación de BrdU, ya que al coincidir la fase S con el período de luz, la bromación produce fotosensibilidad en el DNA que resulta en alteraciones en el ciclo celular y compromete la viabilidad de los cultivos.

tial sequence of replication of gene families and non-informative DNA in Dinoflagellates. We are trying to characterize their replicatin factories by immunofluorescence, that would allow to solve the enigma of how this non-nucleosomal DNA replicates in the Dinochromosomes, that are permanently condensed during cell cycle. For this we are trying to find an alternative to BrdU for the labeling of the factories, because as S phase occurs during the light period, bromation will cause fotosensitivity in DNA that will result in cell cycle alterations and viability of cultures.

The immunological analysis of the nuclei from several Dinoflagellate species with distant taxonomic positions, suggests that their nucleoplasm is typical of eukaryotes, with two well-defined domains: a perichromosomal region of transcrip-

Figura 2: Visualización al microscopio electrónico de los lazos de DNA descondensados anclados en la periferia de los cromosomas interfásicos de Dinoflagelados mediante tinción preferencial con amina de osmio (AO) e inmunomarcado con oro con un anticuerpo primario contra DNA (α -DNA). Las fibras de DNA descondensadas (flechas) se extienden por los dominios peri- e intercromosómicos que aparecen sin contrastar (AO). El anticuerpo contra DNA revelado por el oro coloidal, muestra la presencia de DNA en estas regiones en asociación con la red de ribonucleoproteínas que contienen los productos de transcripción y splicing. En ambos casos se detectan acumulaciones densas de DNA en el interior de los cromosomas. Barras aumento: AO = 0.5 μ m, α -DNA = 1 μ m.

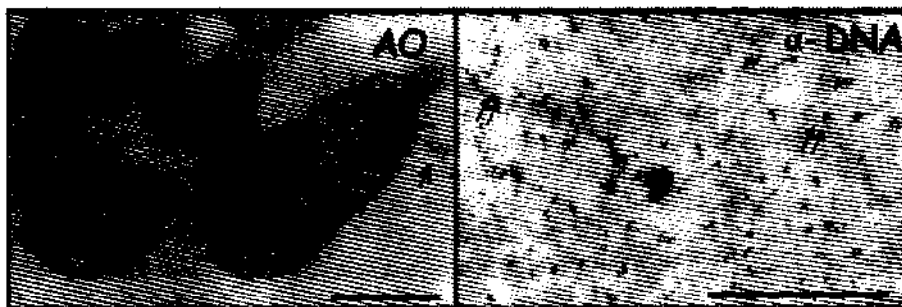


Figure 2: Electron microscope images of the decondensed DNA loops anchored at the peripheries of the Dinoflagellate interphasic chromosomes after either osmium amine preferential staining (AO) or anti-DNA immunogoldlabelling (α -DNA). The decondensed DNA fibres (arrows) pervade the peri- and interchromosomal domains that are not contrasted (AO). The gold particles confirm that the contrasted loops contain DNA and are associated with the ribonucleoprotein network containing transcription and splicing components. In both cases dense inclusions of condensed DNA are detected in the chromosome cores. Scale bars: AO = 0.5 μ m, α -DNA = 1 μ m.

El análisis inmunológico y de microscopía electrónica del núcleo de varias especies de Dinoflagelados con posiciones taxonómicas muy distantes sugiere que éstos poseen un nucleoplasma de tipo eucariótico con dos dominios topológicos bien definidos: una región pericromosómica donde se produce la

tion and ribonucleoprotein accumulation, and the interchromosomal region enriched in highly phosphorylated proteins. Our confocal microscopy data localize the transcription/splicing domains at the chromosome periphery where the decondensed DNA loops also localize, and we have also described for the first

transcripción y se acumulan las ribonucleoproteínas y una región inter cromosómica rica en proteínas altamente fosforiladas. Se han obtenido resultados experimentales muy satisfactorios mediante microscopía confocal de la caracterización de los sitios de transcripción/splicing en la periferia de los cromosomas mediante anticuerpos contra las proteínas Sm de los snRNPs y, por primera vez, se ha descrito la existencia de cuerpos de Cajal implicados en la maduración de los snRNPs en Dinoflagelados. Estos resultados son concordantes y complementarios a los de microscopía electrónica (Fig 2), y sugieren que a pesar de la carencia de histonas, la organización básica de los procesos de transcripción y *splicing* en Dinoflagelados es de tipo eucariota, en contraste con otros phyla de protista que no poseen un patrón conservado de organización nuclear (Alverca, E., Franca, S and Moreno Díaz de la Espina, S. In: *Microscopy* 2, 137-138 (2001).

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

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

La obtención de embriones de alta viabilidad es de interés prioritario para los programas genéticos de conservación de especies amenazadas y ganadería. Para optimizar estas técnicas se requiere determinar la incidencia de los diversos factores implicados en las técnicas de reproducción y cultivo in vitro, en los distintos estadios del proceso. En colaboración con el Departamento de Reproducción Animal del INIA, nuestro grupo

time Cajal bodies, involved in the snRNP maturation, in this Phylum. These results are in agreement with those of electron microscopy (Figure 2), and 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 (Alverca, E., Franca, S and Moreno Díaz de la Espina, S. In: Microscopy 2, 137-138 (2001).

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

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

The production of embryos with high development rates is a priority in the genetic programs of reproduction of endangered species and in cattle breeding. To improve the efficiency of the techniques of embryo culture and reproduction in vitro, the many factors involved in the different steps of the process need to be determined. In collaboration with the Department of Animal Reproduction of the INIA, our group is investigating the alterations affecting the general organisation and cellular ultrastructure of in vitro-cultured embryos. We have previously established by electron microscopy the organisation and cell ultrastructure of embryos from the state of more than 8 cells to blasts, obtained in vivo from superovulated ewes. These results will be compared with the injuries induced by freezing and later thawing with different cryoprotectants. After the comparative analysis of the lesions, a correlation with the survival rates in vitro for each case is performed (Cocero, M.J., Moreno Díaz de la Espina, S., and Aguilar, B. Biol. Reprod. 66, 1244-1258, (2002).

está analizando las alteraciones que afectan a la organización y ultraestructura celular fina de los embriones cultivados in vitro. Para ello se han determinado previamente mediante microscopía electrónica las características de organización y ultraestructura celular de los embriones de mas de ocho células hasta el estadio de blasto obtenidos in vivo de hembras superovuladas . Estos resultados se comparan posteriormente con las lesiones inducidas por el proceso de congelación y posterior descongelación con distintos crioprotectores. Tras el análisis comparativo de las lesiones se efectúa la correlación con los datos de supervivencia in vitro obtenidos en cada caso (Cocero, M.J., Moreno Díaz de la Espina, S., and Aguilar, B. *Biol. Reprod.* 66, 1244-1258, (2002).

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CSIC/JNICT, 2000PT00012 (1998-2001)
- AEI, 99CN0008 (1999-2001)
- DGICYT, PB98 -0647 (2000-2002)
- MAPA, SC00-051-C3-3 (2000-2003)
- DGI-MICYT, BMC2001-2195 (2002-2004)

Publicaciones/Publications

- Acevedo, R., Moreno Díaz de la Espina, S., Fernández Gómez, M.E., Cuadrado, A., Jouve, N., and De la Torre, C. (2001) Dormancy and proliferation in *S. officinarum* X *S. spontaneum* hybrids differing in the number of the *S. spontaneum* chromosomes. *J. Exp. Bot.* 52, 1203-1208.
- Samaniego, R., Yu, W., Meier, I., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2001) Characterization and high resolution subcellular distribution of a MAR-binding protein (MFP1) in onion proliferating cells. *Planta* 212, 535-546.
- Acevedo, R., Samaniego, R., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2002) Coiled bodies in plant nuclei evolving from dormancy to proliferation. *Chromosoma* 110, 559-569.
- Acevedo, R., Cuadrado, A., De la Torre, C., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2002) Behaviour of ribosomal genes and nuclear domains during activation in sugarcane (*Saccharum officinarum*) root primordia: from the unsoaked quiescent state to the steady state of proliferation. *Eur. J. Histochem.* 46, 143-158.
- Cocero, M.J., Moreno Díaz de la Espina, S., and Aguilar, B. (2002) Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. *Biol. Reprod.* 66, 1244-1258

- Cui, P., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2002) Sm and U2B^{''} proteins redistribute to different nuclear domains in dormant and proliferating onion cells. *Planta* 217, (DOI nº 10.1007/s00425-002-0966-3).
- Giménez-Abián, J.F., Clarke, D.J., Giménez-Martín, G., Weingartner, M., Giménez-Abián, M.I., Carballo, M.I., Moreno Díaz de la Espina, S., Bögre, L., and De la Torre, C. (2002) DNA catenations that link sister chromatids until the onset of anaphase are maintained by a checkpoint mechanism. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 9-16, (and cover).
- Giménez-Abián, J.F., Weingartner, M., Binarova, P., Clarke, D.J., Anthony, R.G., Calderini, O., Heberle-Bors, E., Moreno Díaz de la Espina, S., Bogre, L., and De la Torre, C. (2002) A topoisomerase II-dependent checkpoint in G2 phase plant cells can be bypassed by ectopic expression of mitotic cyclin B2. *Cell Cycle* 1, 187-192, (and Views and Commentaries: Decatenation Checkpoint is conserved across the two metazoan kingdoms by W K Kaufmann, 176-177).
- Samaniego, R., De la Torre, C., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2002) Dynamics of replication foci and nuclear matrix during S phase in *Allium cepa* cells. *Planta* 215, 195-204.

Contribución a libros/Contributions to Books

- Alverca, E., Franca, S., and Moreno Díaz de la Espina, S. (2001) Organisation of spliceosomal RNPs in Dinoflagellate Nuclei. In: *Microscopy* 2, 137-138.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Moreno Díaz de la Espina, S., Samaniego, R., Yu, W., and De la Torre, C. (2003) Intermediate filament proteins with nuclear function: NuMA, lamin-like proteins and MFP1. *Cell Biol. Int.* 27, 233-235.
 - Moreno Díaz de la Espina, S., and De la Torre, C. (2003) Coiled coil- and Intermediate Filament- Proteins in the Plant Nucleoskeleton. In: *The Plant Cytoskeleton*. NATO Sciences Series A: Life Sciences. C. Lloyd and Y. Blume eds IOS Press. (en prensa/in press).
 - Cuadrado, A., Acevedo, R., Moreno Díaz de la Espina, S., Jouve, N., and De la Torre, C. (2003) Genome remodelling in three modern *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids sugar cane cultivars. *Chromosoma* (en prensa/in press).
-

Nucleolo de Células Vegetales

Plant Cell Nucleolus

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

DAVID LÓPEZ GONZÁLEZ
Investigador Contratado / Research Associate

FRANCISCA LERÍA MOSQUERA (Hasta VI-2001)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

FERNANDO GONZÁLEZ CAMACHO
VICTORIA RODRÍGUEZ VILARIÑO
MARGARYTA A. SOBOL (Desde IV a VII-2002)
Becarios Predoctorales / Graduate Students

MERCEDES CARNOTA ROMERO
NIEVES FONTÚRBEL CABAÑAS (Hasta XI-2002)
Personal Técnico / Technicians

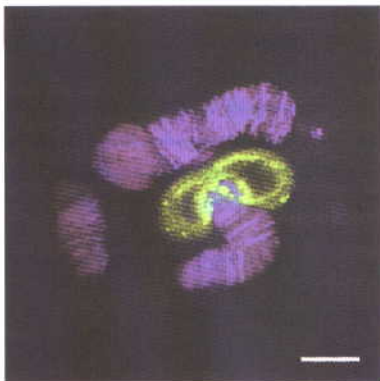


Figura 1: Localización inmunocitoquímica de la proteína nucleolar fibrilarina (color verde) en una célula politenizada de glándulas salivares de larvas del díptero *Chironomus pallidivittatus*. La muestra está contrastada con DAPI, en color azul, para observar simultáneamente la localización del DNA. La proteína aparece exclusivamente localizada en el nucleolo y su distribución subnucleolar determina los sitios en los que ocurre el procesamiento temprano del pre-rRNA. La imagen está obtenida en el microscopio confocal y corresponde a un corte óptico tomado con un intervalo de 0,5 μm en el eje Z. La barra de escala representará 8 μm .

*Figure 1: Immunocytochemical localization of the nucleolar protein fibrillarina (green) in a polytene cell from salivary glands of the dipteran *Chironomus pallidivittatus* larvae. The sample was counterstained with DAPI (blue) to simultaneously observe the localization of DNA. The protein appears exclusively located in the nucleolus and its subnucleolar distribution determines the sites in which early pre-rRNA processing occurs. The image was obtained in the confocal microscope and corresponds to a single optical section taken with a Z-step of 0.5 μm . Scale bar represents 8 μm .*

Palabras clave: Nucleolo, Proteínas nucleolares, Ciclo celular, Biología espacial, Cromosomas politénicos, Ascidias, Drogas antitumorales.

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

La biogénesis de los ribosomas y el ciclo celular son dos procesos celulares fundamentales, mutuamente interrelacionados. Su estudio en células vegetales, en condiciones de gravedad control y en ambiente de microgravedad, es importante como paso previo al cultivo de plantas fuera de la Tierra. Estos cultivos son imprescindibles para los llamados "Sistemas de Soporte Vital", cuya consecución es uno de los grandes objetivos de la Estación Espacial Internacional (ISS), la mayor empresa conjunta realizada por todas las Agencias Espaciales del mundo, la cual se encuentra en plena fase de ensamblaje, no exento de graves contratiempos, como el trágico accidente sufrido por el trasbordador "Columbia".

En esta línea de investigación, hemos avanzado en el conocimiento del ciclo celular en el meristemo de la raíz de plantas, estudiado a través de su influencia en la biogénesis de ribosomas, mediante proteínas nucleolares. Los resultados obtenidos sobre el mecanismo del proceso en las condiciones ambientales de la Tierra nos permiten plantear su estudio en las condiciones de microgravedad propias de un vuelo espacial.

Hemos concentrado nuestra atención en la proteína nucleolar NopA100, la cual se había caracterizado previamente en nuestro laboratorio, habiéndose detectado como una proteína mayoritaria de la fracción soluble del núcleo de las células proliferantes de *Allium cepa*, apareciendo cuantitativamente muy disminuida en células no proliferantes. En un estudio anterior, se obtuvo un anticuerpo frente a ella, demostrándose su localización nucleolar, su fosforilación y su relación con la proteína nucleolar de mamíferos denominada nucleolina. La utilización de poblaciones sincronizadas en cuanto al progreso en el ciclo celular, de células meristemáticas de la raíz, ha permitido demostrar que la proteína presenta una mayor abundancia en el período G2 del ciclo celular y por microscopía óptica y electrónica nos revela una distribución bien definida, concentrándose en el componente fibrilar denso del nucleolo. Se ha estudiado en profundidad el comportamiento de dos modificaciones postraduccionales que regulan la actividad de esta proteína, la proteo-

Keywords: Nucleolus, Nucleolar proteins, Cell cycle, Space biology, Polytene chromosomes, Ascidians, Anti-tumor drugs.

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

Ribosome biogenesis and the cell cycle are two fundamental cellular processes related one another. Their study in plant cells, in conditions of control gravity and in microgravity environment, is important as a preliminary step to plant culture out of the Earth. These cultures are mandatory for the so-called "Life Support Systems", an achievement which is a major objective of the International Space Station (ISS), the largest joint venture of all Space Agencies worldwide, which is currently in its assembly phase, in spite of severe inconveniences, such as the tragic accident suffered by the "Columbia" Space Shuttle.

In this line of research, we have advanced in the knowledge of the cell cycle in the plant root meristem, studied through its influence on ribosome biogenesis by means of nucleolar proteins. The results obtained on the mechanism of this process in the ground environmental conditions will allow us to approach its study in microgravity (spaceflight) conditions.

We have focused our attention on the nucleolar protein NopA100, previously characterized in our laboratory as a major protein of the soluble nuclear fraction from proliferating Allium cepa cells, appearing as quantitatively reduced in non-proliferating cells. In a previous work, we raised an antibody against this protein, and demonstrated its nucleolar localization, its phosphorylation and its relationship with the mammalian nucleolar protein nucleolin. The use of cellular populations, synchronized as to their cell cycle progression, from root meristems, has led to the evidence that the protein shows a higher level in the G2 period; light and electron microscopy reveals a well defined in situ localization, concentrated in the nucleolar dense fibrillar component. We have studied in depth two post-translational modifications of this protein, namely proteolysis and phosphorylation, throughout different periods of the cell cycle as well as in different proliferative states of the cell.

More generally, we have comparatively analyzed the proteomes obtained from the onion root nuclear soluble fraction, containing proteins active in nuclear RNA metabolism, in meristematic (proliferating) versus differentiated (non-proliferating) cells, using two-dimensional electrophoresis.

lisis parcial y la fosforilación, analizándolas en diferentes etapas del ciclo y en distintos estados proliferativos de la célula.

Con carácter más general, se han analizado comparativamente los proteomas obtenidos de la fracción soluble de núcleos de cebolla, que contienen proteínas activas en el metabolismo de los RNAs nucleares, mediante geles bidimensionales obtenidos de células meristemáticas de la raíz (proliferantes) y de células no meristemáticas (diferenciadas) de la raíz.

Además se ha avanzado en la resolución de algunos de los problemas instrumentales y metodológicos que conlleva la experimentación espacial, prestando especial atención a la fijación de muestras biológicas y a la preservación estable de muestras vivas. Algunos de estos trabajos se han realizado en el marco de un "Topical Team" de la ESA coordinado por el Jefe de este Grupo de Investigación.

A finales del año 2002 nos ha sido aceptada la realización de un experimento espacial para ser llevado a cabo en la ISS, dentro de la denominada "Misión Española Soyuz" en la que participará el astronauta español de la ESA Pedro Duque, que viajará a bordo de una nave rusa Soyuz. El experimento consistirá en la germinación de semillas de *Arabidopsis* en condiciones de microgravedad y la fijación de las raíces a bordo, para realizar en tierra estudios microscópicos e inmunocitoquímicos sobre proteínas nucleares y nucleolares.

Esta Línea de Trabajo se desarrolla en colaboración con el Prof. Roberto Marco, del Departamento de Bioquímica de la UAM.

Organización funcional del nucleolo en células politenizadas

En células politenizadas, como las de las glándulas salivares de larvas del díptero *Chironomus*, el DNA se encuentra amplificado, constituyendo los cromosomas politénicos. En particular, el resultado de la amplificación de los genes ribosómicos es un nucleolo gigante que se origina de la expresión de todos estos genes, localizados en un único locus cromosómico, el organizador nucleolar (NOR). Este nucleolo está formado únicamente por dos componentes, el componente granular y el componente fibrilar denso a diferencia de la mayoría de los organismos que poseen además los centros fibrilares. El conocimiento de la organización ultraestructural del nucleolo politenizado de *Chironomus*, además de su interés intrínseco, permite responder a cuestiones de interés fundamental sobre los mecanismos de expresión génica, tales como la actuación independiente o coo-

Furthermore, we have advanced in the resolution of some instrumental and methodological problems subsequent to Space Research, paying special attention to fixation of biological samples and to the stable preservation of living specimens. Some of these works have been carried out in the frame of an ESA Topical Team, co-ordinated by the Leader of this Research Group.

Late in 2002, it has been accepted an experimental project to be carried out in ISS, within the so-called "Spanish Soyuz Mission", in which the Spanish ESA astronaut Pedro Duque will take a part as flight engineer of a Soyuz Russian spacecraft. The experiment will consist on the germination of Arabidopsis seeds in microgravity conditions and the fixation of roots on board, to prepare the samples for further postflight analysis on the ground, using microscopical and immunocytochemical methods, on nuclear and nucleolar proteins.

This line of research is developed in co-operation with Prof. Roberto Marco, from the UAM Biochemistry Department.

Functional Organization of the Nucleolus in Polytene Cells

*In polytene cells, such as those of the salivary glands of the dipteran *Chironomus* larvae, DNA is amplified, forming polytene chromosomes. In particular, the result of the amplification of ribosomal genes is a giant nucleolus which is originated from the expression of all these genes, located in a single chromosomal locus, the nucleolar organizer (NOR). This nucleolus is exclusively formed by two components, namely the granular component and the dense fibrillar component, unlike in most other organisms which, in addition, show fibrillar centers. The knowledge of the ultrastructural organization of the *Chironomus* polytene nucleolus, other than its intrinsic interest, allows us to find the answer to some fundamental pending questions on the gene expression mechanisms, such as the independent or co-operative behavior of the amplified gene units in ribosome biogenesis, or the adscription of precise functions of the process to particular nucleolar structural domains, which are easier to be discriminated in this giant nucleolus than in other non-polytene nucleolar models, which have a smaller space available for allocating the different functional steps.*

Therefore, using as fundamental tools the confocal and the electron microscope, this research line deals with DNA localization by means of cytochemical and immunocytochemical met-

perativa de las unidades génicas amplificadas en la biogénesis de los ribosomas, o la adscripción de funciones concretas del proceso a dominios estructurales del nucleolo, más fácilmente discernibles en este nucleolo gigante que en otros modelos nucleolares no politénicos, que muestran un menor espacio disponible para el desarrollo de cada etapa funcional.

Así pues, utilizando como herramientas fundamentales el microscopio confocal y el microscopio electrónico, en esta línea de trabajo llevamos a cabo la localización del DNA por procedimientos citoquímicos e inmunocitoquímicos, así como por métodos específicos para el rDNA como la hibridación *in situ*. Usando anticuerpos contra proteínas nucleolares, tales como la fibrilarina y la nucleolina, a modo de marcadores de etapas funcionales concretas de la biogénesis de los ribosomas, se puede visualizar donde se produce el procesamiento temprano del pre-rRNA y la maduración de los prerribosomas y realizando ensayos funcionales de transcripción *in situ* (*run on*), se localiza con precisión el lugar de la transcripción, discriminando, de entre todo el rDNA, aquél que se encuentra transcripcionalmente activo. Además se usan activadores (pilocarpina) e inhibidores de la actividad nucleolar (cicloheximida), con objeto de conocer las modificaciones o redistribuciones de los dominios subnucleolares previamente definidos. Finalmente, estamos realizando un acercamiento a funciones hasta ahora desconocidas del nucleolo, no relacionadas con la biogénesis de ribosomas.

Esta Línea de Trabajo se desarrolla en colaboración con el Dr. José Luis Díez, del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo de este Centro.

Estudios morfológicos sobre fármacos antitumorales

Esta Línea de Investigación es el objeto de un contrato de colaboración entre el CSIC y la empresa farmacéutica Pharma-Mar, S.A. El Proyecto tiene por objeto, por una parte, realizar estudios en un organismo marino perteneciente al grupo taxonómico de las Ascidiarias, en el que la empresa está interesada por ser el productor de una sustancia antitumoral, Yondelis® o ET743, que se encuentra en la actualidad en avanzado desarrollo clínico. Por otra parte, se está realizando la localización *in situ* de ciertas drogas antitumorales en el interior de células de mamíferos.

hods, as well as by procedures specific for rDNA such as in situ hybridization. Using antibodies against nucleolar proteins, such as nucleolin and fibrillarlin, as markers for specific functional steps of ribosome biogenesis it is possible to visualize where early pre-rRNA processing and preribosome maturation take place in the nucleolus, and using functional assays of transcription (run-on) the site of transcription can be precisely located, discriminating transcriptionally active DNA from the bulk rDNA. Furthermore, the use of activators (pilocarpin) and inhibitors (cycloheximide) of nucleolar activity allows us to know eventual modifications or redistributions of previously defined subnucleolar domains. Finally, we are also approaching some previously unknown nucleolar functions apparently not related to ribosome biogenesis.

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

Morphologic studies and in situ detection of macromolecules in Ascidiarians

This Research Line is the object of a Contract signed between CSIC and the pharmaceutical company Pharma-Mar, S.A. The Project is aimed to perform studies in a marine organism belonging to the taxonomic group of the Ascidiarians, in which the Company is interested since it is the source of an antitumoral substance, Yondelis® or ET743, which is presently in an advanced phase of clinical development. Otherwise, certain anti-tumor drugs are being located within mammalian cells.

Figura 2: Estudio proteómico de la fracción nuclear soluble en relación al estado proliferativo de la célula. Electroforesis bidimensional de proteínas de esta fracción procedentes de células meristemáticas de la raíz de cebolla (proliferantes) – panel izquierdo – y de células diferenciadas de la raíz (no proliferantes) – panel derecho. En la parte superior se muestra el resultado del *Western blotting* de estas proteínas con anticuerpo anti-NopA100. Las diferencias entre el número y distribución de los *spots*, tanto en el proteoma total, como en las isoformas de la proteína NopA100, dependientes de la proliferación celular, son claramente visibles.

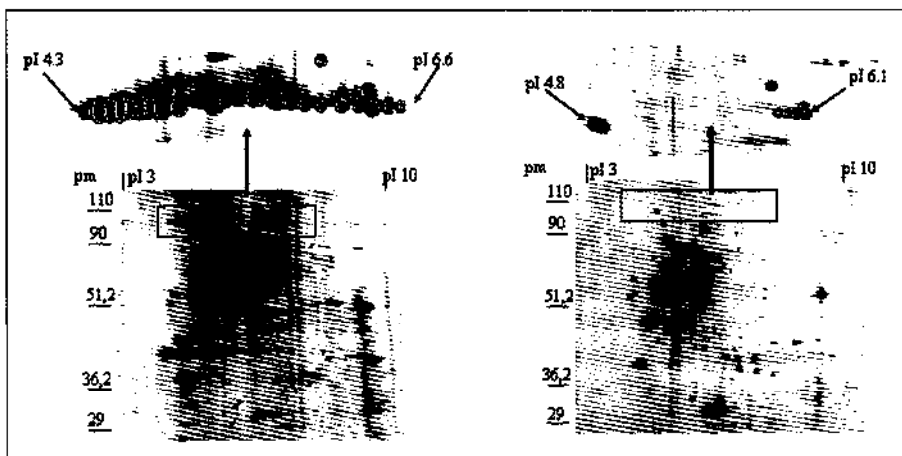


Figure 2: Proteomic study of the soluble nuclear fraction in relation to the proliferative state of the cell. Bidimensional protein electrophoresis of this fraction from onion root meristematic cells (proliferating) – left panel – and from onion root differentiated cells (non-proliferating) – right panel. In the upper part, it is shown the result of Western blotting of these proteins with anti-NopA100 antibody. Differences in the number and distribution of spots in the total proteome, as well as in NopA100 isoforms, depending on cell proliferation, stand out clearly.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- PNI, PNI Espacial, ESP1999-0379-C02-02 (2000-2002)
- ESA, AO-LS-99-LSS-011-TT (2001-2003)
- PNI, PGC, BMC2000-1141 (2000-2003)
- PNI, PNI Espacial, ESP2001-4522-PE (2002-2004)
- Contrato Empresa Pharma-Mar S.A. (2000-2002)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Lería, F., Marco, R., Medina, F.J. (2001) Subcooling – low temperature without freezing – is capable of preserving fixation quality and functional activities in isolated plant cell nuclei. *Biol. Cell* 93, 394-395.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Medina, F.J., (2001) The organization of the expression of ribosomal genes in the plant cell nucleolus: from ultrastructural cytochemistry to run-on in situ. In *Cells III*, J. Berger ed., (Ceske Budejovice: Kopp Publ.), pp. 51-56. ISBN: 80-7232-154-4.
- Medina, F.J., González-Camacho, F., Cerdido, A., De Cárcer, G. (2001) In situ localization of the onion nucleolar protein NopA64 is dependent on cell proliferation mechanisms and cell cycle phases. In *Proc. 5th Multinational Cong. Electron Microscopy*, L. Dini, M. Catalano, eds., (Princeton, New Jersey: Rinton Press Inc.), pp. 197-207. ISBN: 1-58949-003-7
- Medina, F.J., Cogoli, A., Franks, F., Marco, R., Marthy, H.J., Martín-Pascual, C., Kraemer, J., Pastor, M. (2002) Current topics on Sample Preservation. In *Life in Space for Life on Earth*, B. Warmbein, ed., (Noordwijk: ESTEC-European Space Agency, ESA SP-501), pp. 369-370. ISBN: 92-9092-811-5.
- Herranz, R., Husson, D., Pastor, M., Díaz, C., Mateos, J., Villa, A., Medina, F.J., Marco, R. (2002) Towards the establishment of a permanent colony of *Drosophila* in the International Space Station: Hardware tests and adaptation of techniques. In *Life in Space for Life on Earth*, B. Warmbein, ed., (Noordwijk: ESTEC-European Space Agency, ESA SP-501), pp. 411-412. ISBN: 92-9092-811-5.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Lería, F., Marco, R., Medina, F.J. (2003) Structural and antigen preservation of plant samples by microwave-enhanced fixation using dedicated hardware. *Microscopy Res. Technique*. (en prensa/in press).
 - González-Camacho, F., Medina, F.J. (2003) Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis. *Proteomics*. (en prensa/in press).
 - Marco, R., Husson, D., Herranz, R., Mateos, J., Medina, F.J. (2003) *Drosophila melanogaster* and the Future of "Evo-Devo" Biology in Space. Challenges and Problems in the path of an eventual colonization project outside the Earth. En "Advances of Space Biology in Medicine". H.J. Marthy (ed.). (en prensa/in press).
 - Volkov, R.A., Medina, F.J., Zentgraf, U., Hemleben, V. (2003) Nucleolus Organization, Transcriptional Regulation of Ribosomal DNA and Nuclear Dominance. *Progress in Botany*. (en prensa/in press).
-

Desarrollo de Plantas y Organización Nuclear

Plant Development and Nuclear Organization

MARÍA-CARMEN RISUEÑO ALMEIDA
Jefe de Grupo / Group Leader
PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO
Investigadoras de Carrera / Staff Scientists

PABLO GONZÁLEZ-MELENDE DE LEÓN
Investigador contratado / Tenure track scientist

BEGOÑA FADÓN SALAZAR
Doctor Vinculado / Associated Scientist

IDIOLEYDIS ÁLVAREZ (IX a XI-2002)
CECILIA DÍAZ JIDY (IX a XII-2001, IX a XII-2002)
MARGARIDA FORTES (II a VI-2001, II a IX-2002)
ADRIANA LATINO FERRAGUT (Hasta III-2002)
OFELIA SAM MOREJÓN (X a XII-2001, VI a IX-2002)
MARTA SILVA (X a XII-2001, XV a X-2002)
Investigadoras Visitantes / Visiting Scientists
M^a JOSÉ CORONADO ALBÍ (Desde IX-2002)

CARMEN RAMÍREZ CASTILLEJO (Hasta IX-2002)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellows

IVETT BARANY
M^a JOSÉ CORONADO ALBÍ (Hasta VIII-2002)
JOSÉ M^a SEGUÍ SIMARRO (Hasta VII-2001)
B. Predoctorales / Graduate Students

CARLOS ALMARZA SANZ
Personal Técnico / Technician

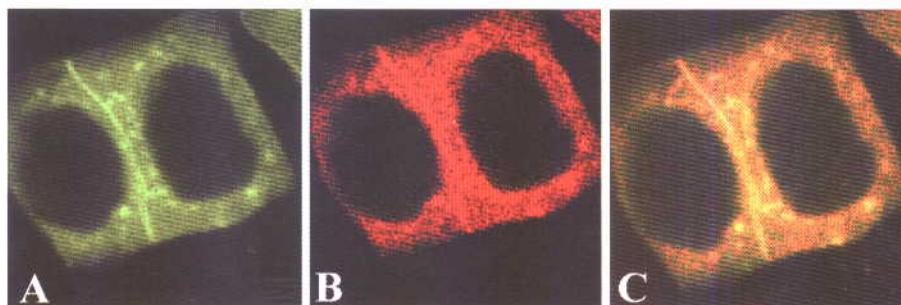


Figura 1: Implicación de proteínas de señalización en la ruta del Golgi y formación de paredes. Colocalización de la MAP quinasa Ntf6 y la proteína beta-COP (marcadora de vesículas de Golgi) en la placa celular en formación en células en proliferación. Análisis confocal de doble inmunofluorescencia: (A) Localización de Ntf6-MAPK, en verde, (B) Localización de beta COP, en rojo, (C) Imagen mezcla, señal de colocalización de ambos antígenos en amarillo-naranja.

Figure 1: Involvement of signalling proteins in the Golgi pathway and the cell wall formation processes. Colocalization of Ntf6-MAPK and beta-COP protein (marker of Golgi vesicles) in the cell plate in formation, in proliferating cells. Confocal analysis of double immunofluorescence: (A) Ntf6-MAPK localization, signal in green, (B) Beta-COP localization, signal in red, (C) Merge, colocalization signal in yellow-orange.

Palabras clave: Polen, Embriogénesis, Microscopía electrónica, MAP quinasas, Desarrollo in vitro

Keywords: Pollen, Embryogenesis, Electron microscopy, MAP kinases, In vitro development

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

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

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

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

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

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

En muchos eucariotas se han identificado numerosos elementos de rutas de transducción de señales implicadas en la entrada en proliferación o en cambios de programas de desarrollo. En plantas, se han encontrado elementos homólogos, aunque se conoce poco sobre su función. Los datos moleculares apuntan que durante la inducción de embriogénesis en la microspora operan rutas de transducción de señales homólogas a las encontradas en otros eucariotas, en las que están involucrados módulos de MAPK ("Mitogen Activated Protein" quinasas). Estudios del grupo han revelado por primera vez la localización ultraestructural de la proteína y los transcritos de un gen homólogo a MAPK aislado en tabaco, y los cambios de expresión y localización en células vegetales quiescentes y en proliferación. Asimismo, hemos determinado la expresión diferencial y entrada en el núcleo celular de MAPKs homólogas de Erk1/Erk2 durante procesos de diferenciación y proliferación en plantas.

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

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

In many eukaryotes, numerous elements of signal transduction pathways involved in the entry in proliferation and changes in developmental programs have been identified. Homologous elements have been found in plants, but their functions are largely unknown. Molecular studies suggest that during the induction of microspore embryogenesis, signal transduction pathways, homologous to those found in other eukaryotes, are operating. In these pathways, mitogen-activated protein kinases, MAPKs, are involved. Studies of the group have revealed for the first time the ultrastructural localization of the protein and transcripts of a MAPK-homologous gene in tobacco, and its changes in expression and localization in quiescent and proliferating plant cells. We have also determined the differential expression of homologues of Erk1/2 MAPKs and their entry into the cell nucleus during plant proliferation and differentiation.

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

Nuclear functional domains related to signalling pathways in plants

Dynamics of the functional and structural domains of plant cell nucleus (condensed chromatin, interchromatin region, and nucleolus) is related to replication, transcription, and RNA processing and transport activities. Their structural organization varies in relation to these activities and during different stages

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

La dinámica de los dominios funcionales y estructurales del núcleo en células vegetales (cromatina condensada, región inter-cromatínica y nucleolo) está relacionada con las funciones de replicación, transcripción, procesamiento y transporte de RNAs, variando su organización estructural en relación a esta actividad y en las diferentes etapas del desarrollo gametofítico y embriónico, así como durante las distintas fases del ciclo celular. El grupo ha estudiado durante años los cambios a nivel subcelular y ultraestructural en los patrones de localización de diferentes macromoléculas implicadas en la síntesis y procesamiento de DNA y RNA heterogéneo y ribosómico, empleando marcadores de estos procesos. Más recientemente se han localizado elementos de diferentes rutas de señalización en el núcleo de células animales. Nuestros estudios han revelado que en plantas se producen cambios en la localización nuclear y citoplásmica de MAPKs y otras proteínas de señalización durante procesos de respuesta a estrés o cambios de programa de desarrollo. Estudios de doble inmunomarcado en combinación con citoquímicas ultraestructurales indican la asociación de factores de señalización a diversos elementos de la maquinaria nuclear, definiendo nuevos dominios estructurales y funcionales en el núcleo asociados a rutas de señalización. Recientemente, el grupo ha determinado la asociación de las MAPKs Erk1/2 y de MAPKs en estado activo con estructuras RNP de la región intercromatínica durante procesos de diferenciación y proliferación en plantas.

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

La microscopía correlativa implica el empleo de abordajes experimentales que permitan visualizar la misma región de la muestra a dos niveles de observación: microscopía óptica y electrónica. En el grupo se desarrollan técnicas y abordajes para relacionar la información complementaria que se obtiene con el uso de diferentes microscopías, DIC, contraste de fase, láser confocal (CLSM) y electrónica de transmisión. Esta línea de trabajo implica varios estudios: a) Optimización de técnicas de procesamiento en frío (criotécnicas) de muestras biológicas, imprescindibles para localizaciones in situ (inmunomarcados, hibridaciones in situ, etc). Estas metodologías conservan la reac-

of gametophytic and embryogenic development, as well as during cell cycle phases. For years, our group has studied the changes, at subcellular and ultrastructural levels, in the localization patterns of different macromolecules involved in DNA, hnRNA and rRNA synthesis and processing, by using markers of these processes. Recently, elements of signal transduction pathways have been localized in the nucleus of animal cells. Our studies have revealed that in plants, changes in the nuclear and cytoplasmic localization of MAPKs and other signalling molecules occur during stress response and developmental program changes. Double labelling studies in combination with ultrastructural cytochemistry point out the association of various signalling factors to elements of the nuclear machinery, these findings define new structural and functional domains associated with signalling pathways in the nucleus. Recently, the group has determined the association of Erk1/2 MAPKs and active MAPKs with RNP structures of the interchromatin region during plant proliferation and differentiation.

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

Correlative microscopy involves the use of experimental approaches for the visualization of the same region of the sample at two levels of observation: light and electron microscopy levels. In the group, approaches and techniques to reveal the complementary information gained by the use of different microscopies, DIC, phase contrast, confocal (CLSM) and transmission electron microscopy, are developed. This topic involves various research subjects: a) Optimization of low temperature methods for processing biological samples (cryotechniques), which are necessary for in situ localizations (immunolabelling, in situ hybridization, etc). These low temperature techniques keep the chemical and antigenic reactivity of the sample, maintain the structure nearer the in vivo state, and minimize the loss of components. The group is a pioneer in the development of these techniques in plants, specifically cryofixation, cryoultramicrotomy, freeze-substitution, and cryo-embedding in Lowicryl resins. b) Development of methods which combine specific cytochemical techniques for nucleic acids and proteins with immunolabelling and other in situ localization techniques. The combination of both procedures in the same sample provides double information: the chemical nature of the structure specifi-

tividad química y antigénica de la muestra, preservando la estructura más cerca del estado in vivo y minimizando la pérdida de componentes. El grupo es pionero en el desarrollo de estas técnicas en plantas, particularmente la criofijación, crioultramicrotomía, criosustitución y crioinclusión en resinas tipo Lowicryl. b) Desarrollo de métodos que combinan técnicas citoquímicas específicas para ácidos nucleicos y proteínas con inmunomarcados y otras técnicas de localización in situ; la combinación de ambos procedimientos en la misma muestra proporciona una doble información: la naturaleza química de la estructura y la localización precisa del antígeno por la partícula de oro coloidal. c) Técnicas de localización in situ empleando sondas y anticuerpos con alta sensibilidad, que permiten detectar con mucha precisión pequeñas cantidades de dianas moleculares en los compartimentos celulares, combinando distintos métodos de visualización con fluorocromos, nano-oro y métodos de amplificación de señales, correlacionando el resultado obtenido en distintas microscopías: óptica (campo claro y contraste de fase) láser confocal, de fluorescencia con cámara CCD, y microscopía electrónica de transmisión. Además, estudios de colocalización múltiple y de rotación de imágenes tridimensionales permitirán analizar la asociación entre antígenos y la distribución espacial de los mismos.

cally stained, and the precise localization of the antigen by the gold particle. c) In situ localization techniques of high sensitivity, using probes and antibodies for detecting low amounts of molecular targets in the cellular compartments. We studied the combination of different detection methods using fluorochromes, ultrasmall colloidal gold particles, and methods to amplify signals, and evaluate the results. Moreover, studies on multiple colocalization and 3D image rotation will permit the analysis of the association between antigens and their espacial distribution.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, PB98-0678 (1999-2002)
- DGEIC-INIA, SC98-081 (1998-2001)
- CM, 07G/0054/2000 (2001-2002)
- AEI, (2001-2003)
- MCYT-CRUP, (Portugal) HP2000-0065 (2000-2001)
- MCYT-DAAD, (Alemania) HA2001-0086 (2002-2003)
- MCYT-CNRS, (Francia) HF2001-0154 (2002-2003)
- CSIC-CITMA, (Cuba) 2001CU0018 (2001-2002)
- CSIC-Acad. Eslovaca de Ciencias 2002SK0001 (2002-2003)
- CSIC-CNR, (Italia) 2001 IT 0017 (2001-2002)
- UE, Cost Action 843 (2000-2004) y Cost Action 851 (2001-2005)
- MCYT, Red de Genómica Funcional en Especies de Interés Forestal (2002)

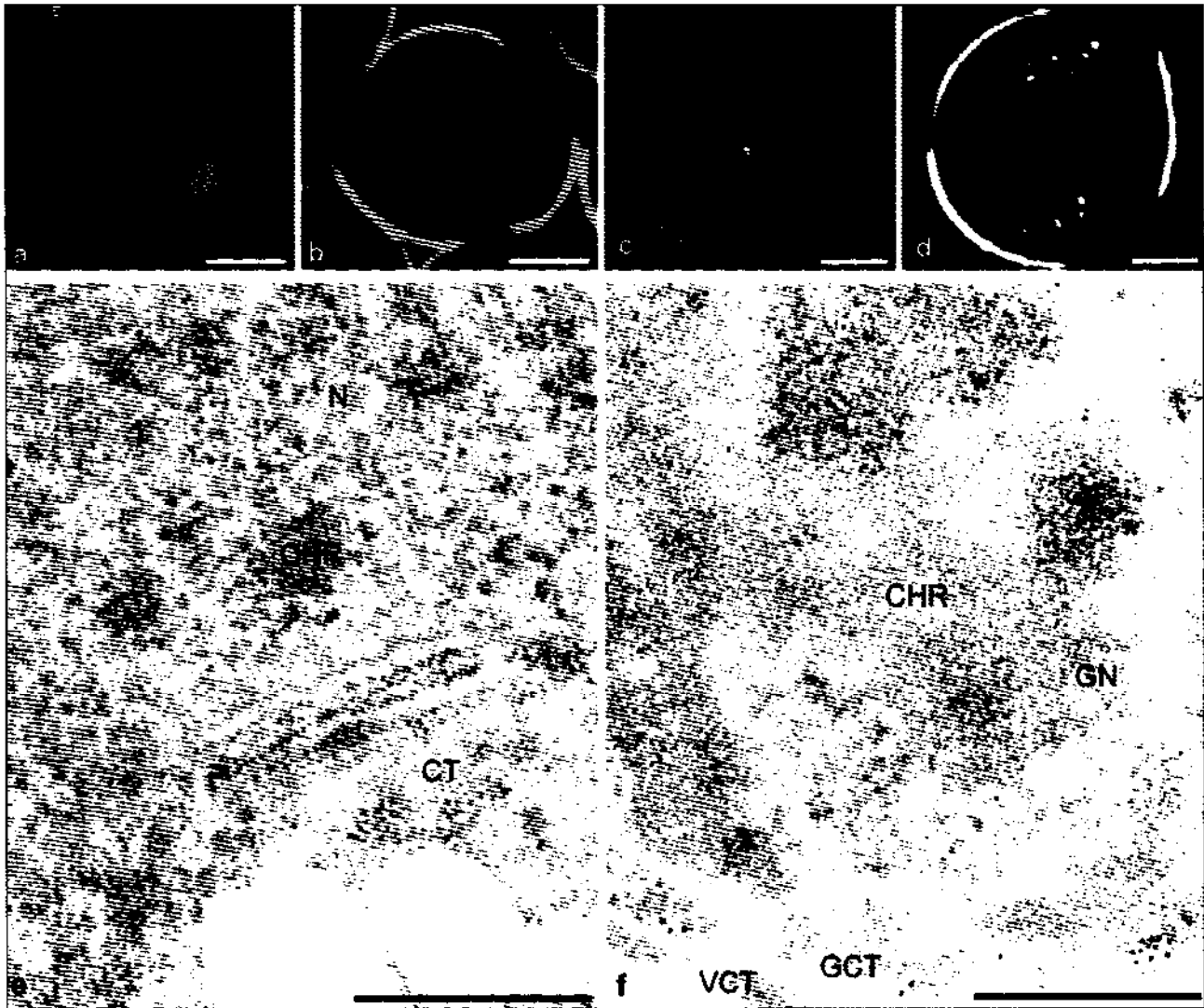


Figura 2: Expresión diferencial y localización subcelular de MAPKs Erk1/2 durante la diferenciación del grano de polen. En la fase de polen joven (a, b, e) existe muy baja expresión, siendo su localización citoplásmica. Más adelante, en la fase de polen maduro (c, d, f) aumenta la expresión de Erk1/2, localizándose mayoritariamente en el núcleo, en áreas de la región intercromatínica. a, c: tinción con DAPI, b, d: inmunofluorescencia en criocortes; e, f: inmunomarcado con oro. Barras en a-d: 10 μ m, en e, f: 0.5 μ m

Figure 2: Differential expression and subcellular localization of Erk1/2 MAPKs during pollen differentiation. In young pollen stage (a, b, e) there is a low expression, and the localization is cytoplasmic. Later, in mature pollen stage (c, d, f) the expression increases, being mainly localized in the nucleus, in areas of the interchromatin region. a, c: DAPI staining; b, d: immunofluorescence on cryosections; e, f: immunogold labelling. Bars in a-d: 10 μ m, in e, f: 0.5 μ m.

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- José María Seguí Simarro. Inducción de embriogénesis de polen: caracterización celular y localización in situ de proteínas de estrés. Universidad Complutense, 2001. Directoras: Dras. María del Carmen Risueño y Pilar S. Testillano.
- María José Coronado Albi. MAP quinasas durante el desarrollo y embriogénesis del polen: expresión y localización in situ. Universidad Complutense, 2002. Directoras: Dras. María del Carmen Risueño y Pilar S. Testillano.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Barany, I., Testillano, P.S., Mityko, J., and Risueño, M.C. (2001) The switch of the microspore developmental program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *Inter. J. Dev. Biol.* 45 Supp.1, 39-40.
- Fortes, A.M., Testillano, P.S., Risueño, M.C., and Pais, S. (2001) Involvement of callose and cutin on organogenic nodule formation of *Hop.* *Biol. Cell* 93, 378-379.
- Heberle-Bors, E., Voronin, V., Touraev, A., Testillano, P.S., Risueño, M.C., and Wilson, C. (2001) MAP kinase signaling during pollen development. *Sex. Plant Reprod.* 14, 15-19.
- Jouannic, S., Champion, A., Seguí-Simarro, J.M., Picaud, A., Tregear, J., Testillano, P.S., Risueño, M.C., Simanis, V., Kreiss, M., and Henry, Y. (2001) The protein kinases AtMAP3Ke1 and BnMAP3Ke1 are functional homologues of *cdc7p* and may be involved in cell division. *Plant J.* 26, 637-649.
- Pihakaski-Maunsbach, K., Moffatt, B., Testillano, P.S., Risueño, M.C., Griffith, M., and Maunsbach, A.B. (2001) Genes encoding chitinase-antifreeze proteins are regulated by cold and expressed by all cell types in winter root shoots. *Physiol. Plantarum* 112, 359-371.
- Ramírez, C., Testillano, P.S., Castillo, A.M., Vallés, M.P., Coronado, M.J., Cistué, L., and Risueño, M.C. (2001) The early microspore embryogenesis pathway in barley is accompanied by concrete ultrastructural and expression changes. *Inter. J. Dev. Biol.* 45 Supp.1, 57-58.
- Bonello, J.F., Sevilla-Lecoq, S., Berne, A., Risueño, M.C., Dumas, C., and Rogowsky, P. (2002) ESR proteins are secreted by the cells of the embryo surrounding region. *J. Exp. Bot.* 53, 1559-1568.
- Coronado, M.J., González-Melendi, P., Seguí, J.M., Ramírez, C., Barany, I., Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (2002) MAPKs entry into the nucleus at specific interchromatin domains in plant differentiation and proliferation processes. *J. Struct. Biol.* 140, 200-213.
- Fortes, A.M., Testillano, P.S., Risueño, M.C., and Pais, M.S. (2002) Studies on callose and cutin during the expression of competence and determination for organogenic nodule formation from internodes of *Humulus lupulus* var. Nugget. *Physiol. Plantarum* 116, 113-120.
- Testillano, P.S., Ramírez, C., Doménech, J., Matthys-Rochon, E., and Risueño, M.C. (2002) Early microspore maize embryos show two domains with defined features also present in zygotic embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 1035-1047.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Nieva, C., Lumbreras, V., Kizis, D., Ramírez, C., Testillano, P.S., Risueño, M.C., and Pagès, M. (2001) Expression and subcellular

localization of transcription factors involved in ABA and water stress regulation of the rab genes from maize. In: "Microscopy 2001". Univ. Barcelona. Baucells M. (ed) pp. 147-148.

- Ramírez, C., Testillano, P.S., Pintos, B., Moreno, M.A., Domenech, J., Gómez, A., Manzanera, J.A., Bueno, M.A., and Risueño, M.C. (2001) Cellular characterization on microspore embryogenesis in anther culture of *Quercus suber* In: "Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells" Official Publications of the European Communities, Brussels. Ed: B. Bohanec. pp. 247-251.
- Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2001) Reprogramación del polen a embriogénesis mediante tratamientos de estrés. En: *Palinología, Diversidad y Aplicaciones*. Fombella MA, Fernández D, Valencia RM (eds.) Secretariado de Publicaciones Universidad de Leon. pp. 17-42.
- Testillano, P.S., Coronado, M.J., Barany, I., Latino, A., Seguí, J.M., Ramírez, C., Díaz-Mendoza, M., and Risueño, M.C. (2001) Defined cellular markers including specific MAPK distribution in two pollen developmental programs. In: "Microscopy 2001", M.Baucells (ed). Univ. Barcelona. pp. 68-69.
- Testillano, P.S., Coronado, M.J., Seguí, J.M., González-Melendi, P., Ahmadian, P., Domenech, J., Fadón, B., and Risueño, M.C. (2001) Early Microspore Embryogenesis: Ultrastructure And In Situ Localization Studies. In: "Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells", Official Publications of the European Communities, Brussels. Ed: B. Bohanec. pp. 229-235.
- Testillano, P.S., Seguí, J.M., Coronado, M.J., González-Melendi, P., Latino, A., Ramírez, C., Fadón, B., and Risueño, M.C. (2001) Nuclear changes involving signalling-related domains accompany the reprogramming of the microspore In: "Microscopy 2001", M.Baucells (ed). Univ. Barcelona. pp. 131-132.
- Coronado, M.J., Testillano, P.S., Wilson, C., Vicente, O., Heberle-Bors, E., and Risueño, M.C. (2002) Differential MAPK expression and localization during pollen development and embryogenesis. In: "Electron Microscopy 2002", Cross R. (ed.) Microscopy Society of Southern Africa, Durban, South Africa. pp. 725-726.
- Ramírez, C., Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (2002) Newly-formed cell walls exhibit a high expression of esterified pectins in the onion root meristem. In: "Roots, the dynamic interface between plants and the earth", Abe J. (ed.) Univ. of Tokyo, Nagoya, Japan. pp. 218-219.
- Testillano, P.S., Barany, I., Latino, A., Coronado, M.J., Ramírez, C., Seguí, J.M., Díaz-Mendoza, M., González-Melendi, P., and Risueño, M.C. (2002) La reprogramación de la microspora hacia embriogénesis implica cambios ultraestructurales específicos. En: *Avances en Palinología*. Grau S. (ed.). Publicaciones de la Universidad de Cartagena. pp. 333-350.

Artículos in press/Forthcoming articles

- Bueno, M.A., Sepúlveda, F., Gómez, A., Seguí, J.M., Testillano, P.S., Manzanera, J.A., Risueño, M.C. (2003) Pollen embryos originated in long-term anther cultures of *Quercus suber* L. reproduce zygotic embryo structure and cell organization keeping haploidy. *J. Plant Physiol.* (en prensa/in press).
- Ramírez, C., Chiancone, B., Testillano, P.S., García-Fojeda, B., Germana, A., and Risueño, M.C. (2003) First embryogenic stages of Citrus microspore-derived embryos. *Acta Bot. Cracov.* (en prensa/in press).
- Sam, O., Ramírez, C., Coronado, M.J., Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (2003) Changes in tomato leaves induced by NaCl stress: tissular organization and cellular ultrastructure. *Biol. Plantarum* (en prensa/in press).
- Seguí-Simarro, J.M., Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (2003) Hsp70 and Hsp90 Change Their Expression and in situ Localization After Microspore Embryogenesis Induction in *Brassica napus* cv. Topas. *J. Struct. Biol.* (en prensa/in press).

Patogénesis de Virus de Plantas y Mecanismos de Resistencia en Plantas

Plant Viral Pathogenesis and Plant Defense Mechanisms

ISABEL GARCÍA LUQUE
M^a TERESA SERRA YOLDI
Jefes de Grupo / Group Leaders

VENELIN CHRISTOV
MÓNICA DORADO PINEDA
M^a LUISA PÉREZ BUENO
ELISAVETA STOIMENOVA
Investigadores Visitantes / Visiting Scientists

PATRICIA GILARDI NAVARRO (Hasta XII-2002)
M^a ÁNGELES GUEVARA MORATO
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

ALFONSO BONILLA MARTÍNEZ (Desde XII 2002)
MYRIAM MOLINA GALDEANO
ARÁNZAZU MORENO LOZANO (Hasta VI-2002)
ISRAEL PAGÁN MUÑOZ (Desde VI-2001)
MARGARITA RUIZ DEL PINO
MARTA TIMÓN SÁNCHEZ (I a IX-2002)
GEMA VILA CAMBRA (Desde II-2002)
B. Predoctorales / Graduate Students

MONSERRAT LLORENTE DE MINGO
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Patogénesis viral, Resistencia vegetal

Las líneas de trabajo que venimos desarrollando en nuestro grupo cubren diversos aspectos de los procesos que concurren en el establecimiento de la infección viral, de los efectos de la infección sobre el metabolismo celular, así como de los mecanismos de defensa que la planta desarrolla para impedir su invasión por el agente patógeno.

Keywords: Plant virus pathogenesis, Plant resistance mechanisms

Ongoing research in our working group covers different aspects of the processes required for the viral infection to take place, the effect of the infection upon the host metabolism as well as the defence mechanism(s) that the host have developed to counteract its invasion by the pathogen.

Mecanismos de resistencia vegetal frente a las infecciones virales

El interés de nuestro trabajo se centra en el estudio de los mecanismos de defensa de las plantas, que conllevan a la restricción del agente patógeno a los lugares de entrada, evitando su diseminación al resto de la planta. Para ello, utilizamos como sistema modelo plantas del género *Capsicum* resistentes a los tobamovirus, donde llevamos a cabo la caracterización de la respuesta de defensa. Esta resistencia se manifiesta mediante una reacción hipersensible y se caracteriza por la activación de la muerte celular programada y de genes involucrados en la defensa vegetal.

En este sistema, estamos caracterizando las proteínas y mRNAs cuya expresión se modifica durante la activación de la HR, y llevamos a cabo el análisis de la función de dichos genes sobre el proceso de la infección viral.

Mecanismos de patogénesis viral

Asimismo analizamos los mecanismos involucrados en la gama de huéspedes de los tobamovirus del moteado suave de la paprika y del pimiento en solanáceas. Hemos establecido que dependiendo del sistema huésped-virus, la restricción de la infección en plantas de tomate y tabaco es debida a la incapacidad del virus para replicarse, para realizar el movimiento a larga distancia o a la activación de mecanismos de silenciamiento génico posttranscripcional. En este contexto, llevamos a cabo la identificación de los factores virales implicados en dichas funciones.

Por otro lado, analizamos la relación entre la estructura y la función de la proteína de movimiento del virus del mosaico del pepino.

Hemos llevado a cabo el estudio de la funcionalidad de mutantes de delección de dicha proteína, expresada constitutivamente en plantas de *Nicotiana*, en los procesos del movimiento viral a corta y larga distancia, lo que nos ha permitido identificar dominios involucrados en dichos procesos, y cuya caracterización estructural es objeto actual de estudio.

Finalmente, en colaboración con el grupo de la Dra. Barón Ayala, de la EEZ. CSIC, estamos analizando las alteraciones que sufre el aparato fotosintético como consecuencia de la infección viral. Usando como sistema huésped-patógeno modelo

Plant defence mechanisms against virus infection

*The general aim of our work is to study plant defence mechanism(s) against virus infection, that lead to the restriction of the pathogen to the primary infection sites. Thus, limiting the further viral spread to other parts of the plant. As model system, we use tobamoviruses-resistant *Capsicum* spp. In this model, the resistance is manifested as a hypersensitive reaction (HR), characterized by the activation of programmed cell death and the induction of defence-related genes.*

We are carrying out the characterization of proteins and mRNAs whose expression is modified during the activation of the HR. We are currently analyzing the effect of those genes upon the viral infection process

Plant virus pathogenesis

It is our interest to get insights into the basic mechanisms underlying the host range of pepper and paprika mild mottle tobamoviruses in the Solanaceae family. So far, we have established that depending upon the host-virus combination, the inability of these viruses to fully infect tomato and tobacco plants is due to the activation of a host defence reaction or to the inability of the virus to either replicate or move long-distance along the plant. In this context, we are carrying out the identification of the viral factors involved in these processes.

On the other hand, we are currently analyzing the structure and function relationship of cucumber mosaic virus movement protein.

We have identified several domains of the protein involved in the short- and long-distance viral movement processes. The structural analysis of the protein is actually in progress.

*Finally, in collaboration with Dr. Barón Ayala (EEZ. CSIC. Granada), we are studying the effect of the viral infection upon photosynthesis. Using as model system *Nicotiana-tobamoviruses*, we have established that viral infection produces a reduction of the photochemical efficiency of photosystem II. This effect can not be ascribed to a direct interaction of the viral coat protein with this complex from the thylakoid membranes, as previously proposed. Instead, another viral factors are required. We have also established that the viral infection causes a transcriptional inhibition of genes encoding chloroplast proteins involved in several metabolic pathways. This effect is more severe on*

Nicotiana-tobamovirus, hemos establecido que la infección viral produce una reducción de la eficiencia fotoquímica del Fotosistema II (Fot II). Estos cambios en la funcionalidad del Fot II no pueden ser adscritos a una interacción directa de la proteína de cubierta viral (CP) con este complejo de las membranas tilacoidales, tal y como había sido postulado con anterioridad, sino que se requiere el concurso de otros factores virales.

Así mismo, hemos establecido que durante la infección viral se produce una inhibición transcripcional de genes que codifican proteínas del cloroplasto involucradas en distintos procesos metabólicos, si bien el efecto es más acusado sobre genes nucleares que cloroplastídicos. La tasa de inhibición es dependiente de la cepa viral.

nuclear-encoded genes than on chloroplast-encoded ones. The inhibitory effect depends upon the viral strain.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, BIO98-0860-C02-01 (1998-2001)
- CAM/CSIC (2000-2004)
- CAM, 07G/0037/2000 (2001-2002)
- M^o AA EE, 2001BG0008 (2001-2002)
- CICYT, BIO2001-1937-C02-01 (2001-2004)
- Western Seed España SA, (2001-2003)

Patentes/Patents

- Martínez García, B., Fernández Marco, C., Aranda Regules, M., López Abella, D., Serra Yoldi, M.T. y López-Moya Gómez, J.J. (2002) Sistema de detección serológica del virus del amarilleo de las venas del pepino, cucumber vein yellowing virus (CVYV). Solicitud de Pat. Española N^o 200202875.
-

Virología Molecular de Plantas

Plant Molecular Virology

Grupo1 / Group 1

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

FRANCISCO TENLLADO PERALO
Investigador Contratado / Research Associate

PABLO GONZÁLEZ JARA (Hasta VI-2002)
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellow

DANIEL BARAJAS RAMÍREZ
YOLANDA MARISOL VARGAS CONCHA (Desde XII-2001)
B. Predoctorales / Graduate Students

FÉLIX ALEJANDRO ATENCIO
DORA KÁLMAN (IV a VIII-2001)
Investigadores Visitantes / Visiting Scientists

Grupo2 / Group 2

DIONISIO LÓPEZ ABELLA
Jefe de Grupo / Group Leader
JUAN JOSÉ LÓPEZ-MOYA GÓMEZ
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

CÉSAR LLAVE CORREAS (Desde VII-2002)
Investigador Contratado / Research Associate

BELÉN MARTÍNEZ GARCÍA
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

LOURDES FERNÁNDEZ CALVINO (Desde IV-2001)
ELISA GOYTIA PASQUÍN (Desde VII-2002)
VIRGINIA RUIZ FERRER
B. Predoctorales / Graduate Students

CLAUDIA BOEING (III a XI-2002)
Investigadora Visitante / Visiting Scientist

Grupos / Groups 1 y 2

DIEGO DÍAZ IZQUIERDO (Desde V-2001)
MONSERRAT LLORENTE DE MINGO
Personal Técnico / Technicians

Palabras clave: Virus vegetales, Transmisión por insectos, Pulgones, Mosca blanca, Resistencia transgénica, Silenciamiento génico, RNA interferencia, RNA de doble cadena, Control de enfermedades.

Grupo 1
Control de enfermedades virales en plantas: mecanismos de silenciamiento génico y resistencia transgénica a virus

Numerosas secuencias de genes, derivadas de muchos virus de plantas diferentes, se han introducido en una gran variedad de especies de plantas, para producir plantas transgénicas protegi-

Keywords: *Plant viruses, Insect transmission, Aphids, Whiteflies, Transgenic resistance, Gene silencing, RNA interference, Double-stranded RNA, Disease control.*

Group 1
Plant virus disease control: mechanisms of gene silencing and transgenic resistance to viruses

Gene sequences derived from many different plant viruses have been introduced into a wide variety of plant species to produce transgenic plants protected against virus infection, a strategy known as pathogen-derived transgenic resistance. In many

Figura: Extractos crudos de RNA de doble cadena (dsRNA) expresados en bacterias se pueden usar para proteger plantas frente a infecciones virales, por un mecanismo de interferencia de RNA (RNAi) dependiente de homología.

A). Respuesta de plantas de *Nicotiana benthamiana* a una combinación del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) más una preparación de dsRNA homólogo (izquierda) o heterólogo (derecha). Las plantas se inocularon con mezclas de PMMoV (5 µg/ml) y preparaciones de lisados de French Press diluidos 1:2 y derivados de bacterias que expresan repeticiones invertidas correspondientes a la región 54K del genoma de PMMoV (izquierda) o a la región HC-Pro del genoma del virus de la sharka (PPV) (derecha). Las plantas que muestran los síntomas de enfermedad (derecha) o la protección a la infección viral mediada por iRNA (izquierda) se fotografiaron a los 30 días post inoculación (dpi).

B). Después de 7 dpi se ensayaron extractos de hojas sistémicas diluidos 1:1000 en medias hojas opuestas del huésped *N. tabacum* cv. *Xanthi nc*, productor de lesiones locales, como indican las flechas. En la media hoja de la izquierda, inoculada con los extractos derivados de plantas protegidas, no se observó ninguna respuesta local visible de infección mientras que en la media hoja de la derecha se observaron gran número de lesiones locales.

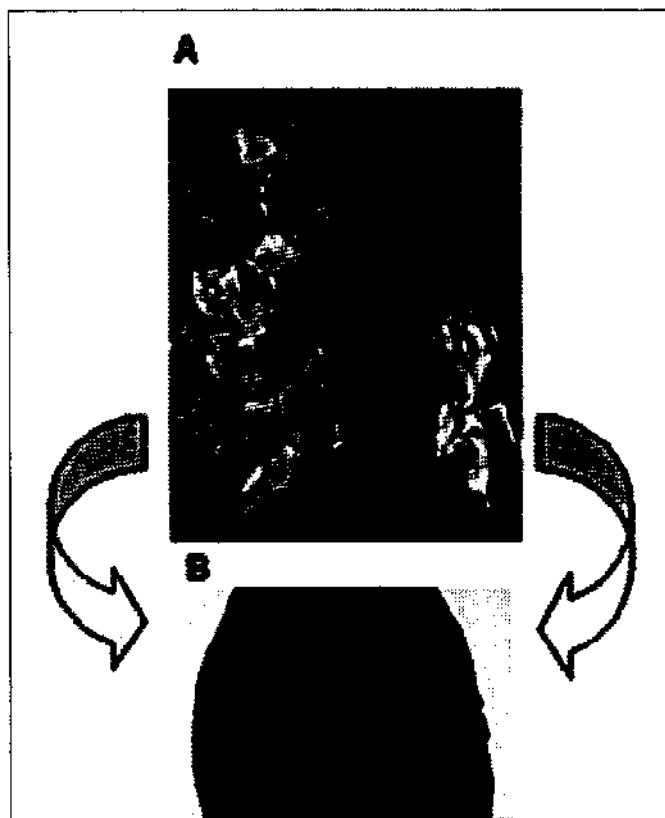


Figure: Crude extracts of bacterially expressed double stranded RNA (dsRNA) can be used to protect plants against virus infections by a homology-dependent RNA interference (RNAi) mechanism.

A). Response of *Nicotiana benthamiana* plants to a combination of pepper mild mottle virus (PMMoV) plus either homologous (left) or heterologous (right) dsRNA preparations. Plants were inoculated with mixtures of PMMoV (5 µg/ml) plus 1:2 diluted French Press lysate preparations derived from bacteria expressing inverted repeats corresponding to the 54K region of the PMMoV genome (left) or to the HC-Pro region of plum pox virus (PPV) genome (right). Plants displaying disease symptoms (right) or showing iRNA-mediated protection to virus infection (left) were photographed at 30 days post inoculation (dpi).

B). After 7 dpi, 1:1000 diluted extracts from systemic leaves were assessed on opposite half-leaves of the local lesion host *N. tabacum* cv. *Xanthi nc* as indicated by arrows. No visible local response of infection was observed in the half-leaf shown at the left inoculated with plant extracts derived from the protected plants while large numbers of local lesions were observed in the half-leaf shown at the right.

das frente a la infección por estos virus, una estrategia conocida como resistencia transgénica derivada del patógeno. En muchos casos, se sabe que el mecanismo de la resistencia es un proceso posttranscripcional, mediado por RNA, que señala, de una forma específica de secuencia, tanto al RNA viral como al mRNA del transgén, para su degradación.

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

Se conocen también procesos mecánicamente similares en animales (RNA interferencia, RNAi) y este sistema de degradación de RNA dependiente de homología parece operar como un mecanismo conservado que actúa frente a parásitos moleculares en casi todos, si no todos, los eucariotas. Además, se sospecha ampliamente que RNAi puede también servir como un sistema antiviral en vertebrados. El RNA de doble cadena (dsRNA) es ampliamente reconocido como el inductor de estos procesos de silenciamiento de RNA en plantas y animales, y el silenciamiento de genes diana se puede inducir en una variedad de organismos suministrando moléculas homólogas de dsRNA.

En esta línea, nuestro grupo mantiene, durante los últimos años, un programa de investigación orientado hacia el control de enfermedades virales en plantas. Recientemente, el énfasis se ha puesto en: 1) el análisis de estrategias de resistencia transgénica a virus en plantas, derivada del patógeno, y la elucidación de los mecanismos celulares y moleculares que controlan la resistencia; 2) el análisis del mecanismo de defensa antiviral en plantas mediado por silenciamiento génico y el estudio de los supresores virales de silenciamiento génico y 3) el análisis del mecanismo de interferencia con las infecciones virales en plantas inducido por dsRNA.

cases, it is known that the mechanism of the resistance is a post-transcriptional, RNA-mediated process that targets both the viral RNA and the transgene mRNA for degradation in a sequence-specific manner.

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

Mechanistically similar processes are also known in animals (RNA interference, RNAi) and this homology-dependent RNA degradation system seems to operate as a conserved mechanism acting against molecular parasites in most, if not all, eukaryotes. Moreover, it has been widely conjectured that RNAi may also serve as an antiviral system in vertebrates. Double-stranded RNA (dsRNA) is widely recognized as the inducer of these RNA silencing processes in plants and animals, and silencing of target genes can be induced in a variety of organisms by providing homologous dsRNA molecules.

Along this line, our group maintains a research program, over the last years, focused toward the plant virus disease control. Recently, the emphasis has been on: 1) the analysis of pathogen-derived, transgenic resistance strategies to viruses in plants and the elucidation of the cellular and molecular mechanisms controlling resistance; 2) the analysis of the gene silencing-mediated antiviral defense mechanism in plants and the study of viral suppressors of gene silencing and 3) the analysis of the dsRNA-induced interference mechanism with plant virus infections.

Group 2

Viral transmission by vectors

The majority of plant viruses depend for their natural spreading of different vector organisms, mainly insects. Vector transmission is therefore an essential point in the pathogenic cycles of viruses, which could serve to establish control measures against virus-caused diseases. Specially attractive will be the

Grupo 2**Control de virus vegetales: mecanismos de transmisión por vectores**

Los virus vegetales dependen en su mayoría de diversos tipos de organismos vectores, fundamentalmente insectos, para llevar a cabo su difusión natural. En los ciclos patogénicos la transmisión por vectores constituye un punto esencial, que puede servir por tanto para ejercer medidas de control sobre las enfermedades virales. Resulta especialmente atractiva la posibilidad de interferir con el proceso sin utilizar tratamientos con plaguicidas, reduciendo de esa manera el impacto sobre el medio ambiente que presenta este tipo de estrategias.

La familia de virus más numerosa es la denominada Potyviridae, en la que se encuadran mayoritariamente virus transmitidos de forma no circulativa y no persistente por pulgones (género *Potyvirus*) y también algunos importantes patógenos que dependen para su transmisión de otros vectores, como las moscas blancas (género *Ipomovirus*). Existen potyvirus capaces de afectar a numerosos cultivos agrícolas de gran importancia económica, como por ejemplo el virus de la Sharka (PPV) en frutales, o el virus Y de la patata (PVY) en hortalizas. Entre los ipomovirus transmitidos por mosca blanca destaca el virus del amarilleo de las venas del pepino (CVYV), recientemente encontrado en nuestro país, y que amenaza seriamente a cultivos de cucurbitáceas.

En el proceso de transmisión de potyvirus por pulgones se ha demostrado que intervienen al menos dos productos génicos virales: la proteína de la cápsida (CP) de las partículas, y un factor de transmisión o componente ayudante (HC). El factor HC es una proteína multifuncional que además interfiere con mecanismos de defensa endógenos de plantas basados en silenciamiento génico. La hipótesis más admitida sobre la funcionalidad del HC en transmisión sugiere que la proteína actúa como puente de unión transitorio regulando la retención y posterior liberación de las partículas virales en los estiletes del aparato bucal del pulgón. En el caso de ipomovirus, se desconoce hasta el momento la implicación de sus productos génicos en transmisión, y se ignora si precisan también un factor ayudante durante el proceso.

Nuestras líneas de trabajo buscan establecer mecanismos de control de virosis a partir del conocimiento de los procesos de transmisión. Objetivos concretos de nuestro trabajo son:

possibility of interfere with the virus transmission process not using pesticides, and thus reducing the negative environmental impact of such treatments.

The largest family of plant viruses is the one named Potyviridae, which includes numerous viruses transmitted by aphids in a non-circulative and non-persistent manner (genus Potyvirus), and also several important pathogens transmitted by different vectors, such as whiteflies (genus Ipomovirus). Potyviruses include many pathogens of economically important crops, for instance plum pox virus (PPV) in stone fruit trees, or potato virus Y (PVY) in horticultural crops. In the case of ipomoviruses, the cucumber vein yellowing virus (CVYV) was recently found in Spain, where it threatens cucurbit crop plants.

During the aphid-transmission process of potyviruses the involvement of two virus-coded products have been demonstrated: the coat protein (CP) and a transmission factor or helper component (HC). This HC product is a multifunctional protein that also can act in the suppression of endogenous defence mechanisms based in gene silencing. The most favoured hypothesis about functionality of HC during transmission is the bridge hypothesis, which implies that the HC acts regulating the transient attachment of virus particles to stylets in the aphid mouthparts. In the case of ipomoviruses, it is not known so far the possible implication of their gene products in transmission, including if they require any kind of helper component.

Our current work is dedicated to the establishment of virus control measures based on the knowledge of the transmission process. Specific objectives are:

Characterization of functional domains of the proteins involved in the transmission process of potyviruses, including both coat protein (CP) and helper component (HC). Our model systems take advantage of infective full-length clones of potyviruses such as PPV or TEV (tobacco etch virus) to perform mutagenesis analysis, and also we use isolates of other viruses such as PVY.

Identification of putative virus retention sites in the insect vector, using HC from different viruses, and virus or protein detection tools able to follow the presence of components in the insect, or their analysis in vitro.

Establishment of expression systems for the HC protein, including functional analysis in transmission. Different hetero-

La caracterización de los dominios de las proteínas implicadas en el proceso de transmisión por pulgones de potyvirus, incluyendo la cápsida de la partícula viral (CP) y la proteína componente helper (HC). Como sistemas de trabajo se dispone de clones completos infectivos de varios potyvirus como PPV y TEV (virus del grabado del tabaco) para realizar análisis mutacionales, y de aislados caracterizados de otros virus de interés como PVY.

Abordar la identificación de los posibles lugares de retención de virus en el insecto vector, utilizando la proteína HC de diversos virus, y sistemas de diagnóstico viral y de detección de proteínas con capacidad para el seguimiento del proceso en el insecto o su análisis *in vitro*.

Establecer sistemas de expresión de la proteína HC, incluyendo análisis de su funcionalidad en transmisión. Se utilizan vectores virales heterólogos y sistemas de expresión (transitoria o transformación estable) en plantas, y también expresión en otros organismos como la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

Determinar las propiedades estructurales y de asociación de la proteína HC, incluyendo información sobre sus interacciones con la CP, y correlacionarlas con su funcionalidad en el proceso de transmisión.

Diseño de moléculas con capacidad de interferencia en los procesos de transmisión, y evaluación de su aplicación a posibles estrategias de control de virus.

Desarrollo de nuevas herramientas serológicas y moleculares para la detección de virus emergentes como CVYV, incluyendo una caracterización molecular del patógeno y un mayor conocimiento de su genoma y propiedades biológicas, con especial interés hacia su transmisión.

Determinación de la posible dependencia de un factor ayudante en la transmisión de ipomovirus por mosca blanca, empleando variantes de CVYV.

alogous viral vectors and transient/permanent transformation systems are being tested in plants, along with expression in other organisms such as the metilotrophic yeast Pichia pastoris.

Identification of structural and association properties of the HC protein, including information about interaction with the CP, and structure/function relations during transmission.

Design of molecules able to interfere in the transmission process, and evaluation of their potential in strategies of virus control.

Development of new serological and molecular tools for detection of emerging viruses such as CVYV, including molecular characterization of the pathogen and a better knowledge of its genome and biological properties, specially its transmission process.

Examine the possibility of helper-dependency in the transmission of ipomoviruses by whiteflies, using variants of CVYV.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- PN I+D, BIO98-0849 (1998-2001)
- CMA, 07B/0026/1999 (2000-2001)
- PN I+D, BIO2000-1605-C02-02 (2000-2002)
- PN I+D, BIO2000-0914 (2000-2003)
- CMA, 07M/0123/2000 (2001-2003)
- PN I+D, AGL2001-2141 (2001-2004)
- CMA, 07M/0072/2002 (2002-2004)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Pablo González Jara. Análisis de la función supresora del silenciamiento génico de la proteína HC-Pro del virus de la sharka (PPV). Universidad Complutense de Madrid, 2002. Director: Dr. José Ramón Díaz-Ruiz Alba

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Martínez-García, B., Llave, C., Atencio, F.A., Díaz-Ruiz, J.R., and López-Abella, D. (2001) La transmisión de los potyvirus por pulgones. (Revisión). *An. Invest. Agr., Producc. y Protecc. Veg.*, 16 (2), 149-168.
- Reyes, F., Reyes, M., Sepulveda, P., Hinrichsen, P., Herrera, G., López-Moya, J.J., and Prieto, H. (2001) New insights on plum pox virus present in Chile. *Acta Horticulturae* 550, 135-140.
- Tenllado, F., and Díaz-Ruiz, J.R. (2001) Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J. Virol.* 75, 12288-12297.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., and Carrington, J.C. (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14, 1605-1619.
- Llave, C., Martínez, B., Díaz-Ruiz, J.R., and López-Abella, D. (2002) Amino acid substitution within the Cys-rich domain of tobacco etch potyvirus HC-Pro result in loss of transmissibility by aphids. *Arch. Virology* 147, 2365-2375.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets direct by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297, 2053-2056.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- López-Moya, J.J. (2002) Genes involved in insect-mediated transmission of plant viruses. In: *Plant Viruses as Molecular Pathogens*, J.A. Khan and J. Dijkstra, ed. (New York: The Haworth Press), pp. 31-51.
- Tenllado, F., Atencio, F.A., González, P., Barajas, D., Kálmán, D., Peña, L., and Díaz-Ruiz, J.R. (2002) Replicase-mediated transgenic resistance to tobamovirus infections. In: *Recent Research Developments in Virology*, Eds.: J.R. Brady et al., Transworld Research Network, Vol. IV.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., and Carrington, J.C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* 4, 205-217.
- Tenllado, F., Barajas, D., Vargas, M., Atencio, F.A., González-Jara, P., and Díaz-Ruiz, J.R. (2003) Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 149-158.
- Tenllado, F., Martínez-García, B., Vargas, M., and Díaz-Ruiz, J.R. (2003) Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotech.* (en prensa/in press).

Patentes/Patents

- Tenllado, F., and Díaz-Ruiz, J.R. (2001) Un método para interferir con la infección de virus en plantas. Número de solicitud Nacional: 200101593, Número de solicitud Internacional: PCT/ES02/00319.
 - Martínez García, B., Fernández Marco, C., Aranda, M., López Abella, D., Serra Yoldi, M.T., and López-Moya, J.J. (2002) Sistema de detección serológica del virus del amarilleo de las venas del pepino, cucumber vein yellowing virus (CVYV). Número de solicitud Nacional: 200202875.
-

Interacciones Planta-Insecto *Insect-Plant Interactions*

PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ
Jefe de Grupo / Group Leader
FÉLIX ORTEGO ALONSO
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

PEDRO HERNÁNDEZ CRESPO (Hasta VII-2001)
GEMA PÉREZ FARINÓS
ISMAEL SÁNCHEZ RAMOS
Investigadores Contratados / Research Associates
FERNANDO ALVÁREZ ALFAGEME (Desde XI-2002)
CRISTINA CABALLERO GARCÍA
MARTA DE LA POZA GÓMEZ
M^a MERCEDES DÍAZ MENDOZA (Desde XI-2001)
CRISTINA MAGAÑA DE LARRIVA (Desde VI-2002)
B. Predoctorales / Graduate Students

M^a TERESA MOÑIVAS RAMOS (Desde VII-2002)
M^a LUISA RUIZ SERRA
Personal Técnico / Technicians



Palabras clave: Taladros del maíz, Escarabajo de la patata, Maíz-Bt, Terpenoides, Inhibidores de proteasas, Ácaros de productos almacenados

Evaluación de compuestos de origen botánico en el control de plagas

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

Se han estudiado mecanismos de protección natural de plantas contra plagas de importancia agrícola, basados en metabolitos secundarios y proteínas de defensa. En todos los casos, el objetivo es profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción de estos compuestos con el objeto de optimizar su eficacia y especificidad contra las plagas y conseguir una baja toxicidad hacia los enemigos naturales.

Keywords: Corn borers, Colorado potato beetle, Bt-maize, Terpenoids, Protease inhibitors, Stored product mites

Potential of botanical compounds for pest control.

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

We are interested in the mechanisms of plant resistance against phytophagous arthropods, mainly those based on secondary metabolites and defense proteins. Knowledge of the mode of action of botanical compounds is essential in order to develop new control strategies with high selectivity and efficacy against pests and with low impact to natural enemies.

*We have studied the effects of naturally occurring terpenoids and semisynthetic derivatives on insect feeding and survival, using as model species an oligophagous coleopteran, the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and a polyp-*

Hemos estudiado los efectos de terpenoides de origen botánico y de derivados estructurales sobre la supervivencia y comportamiento de dos especies modelo: un coleóptero oligófago, el escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata*, y un lepidóptero polífago, la gardama, *Spodoptera exigua*. Se pretende dilucidar la relación estructura química-actividad biológica para facilitar el diseño de moléculas activas más simples, ampliando así su potencialidad como insecticidas biorracionales. De forma análoga, se ha estudiado la actividad de monoterpenos sobre ácaros de importancia económica en jamón y queso, alimentos donde está prohibido el uso productos químicos para su control.

La expresión de proteínas de defensa en plantas mediante técnicas de biología molecular está siendo objeto de gran interés como una nueva vía en el control de plagas. Sin embargo, es necesario un conocimiento detallado a nivel bioquímico y fisiológico del proceso digestivo de la plaga a combatir, así como de su interacción con las proteínas de defensa objeto de estudio. Hemos procedido, por tanto, a la identificación y caracterización de las enzimas proteolíticas y de detoxificación de varias plagas de importancia económica en España, y hemos examinado las implicaciones de la ingestión de estos compuestos sobre la actividad de estas enzimas. Por otra parte, hemos analizado el efecto de la sobre-expresión o supresión de inhibidores de proteasas en plantas transgénicas sobre el desarrollo y el comportamiento alimenticio en insectos. Estos estudios, han permitido demostrar el papel instrumental de genes concretos en la regulación de la expresión inducida por daño en patata, y establecer que diferentes especies de insectos disponen de diferentes mecanismos de respuesta frente a la ingestión de inhibidores.

Implicaciones ambientales del maíz Bt

Desde 1998, en que se inicia la comercialización del maíz Bt en España, alrededor del 5% (~22000 ha) de la superficie cultivada corresponde al maíz Bt (evento 176, cv. Compa CB, Syngenta). El maíz Bt controla de forma efectiva las dos plagas claves el maíz en España, los taladros: *Sesamia nonagrioides* y *Ostrinia nubilalis*. Sin embargo, para mantener la eficacia del maíz Bt, es necesario el desarrollo de programas efectivos de monitoreo de la resistencia que permitan su detección temprana y las actuaciones oportunas. Además, es necesario determinar el impacto potencial del cultivo a gran escala del maíz Bt sobre los artrópodos no diana asociados al cultivo.

hagous lepidopteran, the beet armyworm, Spodoptera exigua. Our aim is to establish the structure-activity relationship that will allow the design of more active and selective molecules, with potential as biorrational insecticides. Likewise, we have tested the activity of several monoterpenoids on stored product mites that are key pests on dry cured ham and cheese, commodities where the use of conventional acaricides is banned.

Transformation of plant genomes with defense proteins represents a complementary approach to pest control. However, it is necessary to gain a comprehensive knowledge of the major digestive enzymes present in a particular species and on how they interact with the appropriate inhibitors, before this approach can be adopted. We have characterized the digestive proteases and detoxification enzymes of several important pests in Spain, and examined the implications of the ingestion of these compounds on the activity of these enzymes. Moreover, we have examined the effect of the suppression or over-expression of protease inhibitors in transgenic plants on insect growth and development. These studies have allowed to point out genes that play an instrumental role in the regulation of wound-induced gene expression in potato, and to establish the physiological responses to the ingestion of inhibitors of different species of insects.

Environmental implications of Bt-maize

*A surface of about 5% (~22000 ha) of Bt-maize (event 176, cv. Compa CB, Syngenta) has been grown annually in Spain since 1998. Bt maize can effectively control the Mediterranean corn borer (MCB), *Sesamia nonagrioides*, and the European corn borer (ECB), *Ostrinia nubilalis*, two key pest of maize in Spain. However, to maintain the effectiveness of Bt maize, it is necessary the development of effective resistance monitoring programs capable of early detection of resistance to allow the implementation of appropriate management decisions in a timely manner. In addition, it is required to assess the potential impacts on non-target arthropods associated with maize crops.*

The development of resistance is a complex phenomenon affected by genetic, environmental and management factors. Knowledge of initial frequencies of the rare and possibly recessive resistance alleles is of basic importance to forecast the durability of Bt-maize and to assess alternative resistance management strategies. A special procedure for identifying such rare resistance alleles in natural populations is the F2-screen.

El desarrollo de resistencia es un fenómeno complejo ligado a factores genéticos, ambientales y de manejo. El conocimiento de la frecuencia inicial de los posibles alelos de resistencia es crucial para predecir la durabilidad del maíz Bt y para valorar estrategias alternativas en el manejo de la resistencia. Un procedimiento para identificar alelos de resistencia en poblaciones naturales es el llamado "F2-screen". Básicamente, esta metodología preserva la variación genética en isolíneas y concentra los alelos de resistencia en genotipos homocigóticos donde pueden ser detectados utilizando dosis discriminantes de la toxina.

Para establecer posibles cambios en la susceptibilidad a la toxina se ha procedido al muestreo anual de poblaciones de ambas especies de taladro en campos de maíz transgénico localizados en las principales zonas maiceras. Se ha puesto a punto un bioensayo para determinar la susceptibilidad a la toxina Cry1Ab mediante análisis probit.

A partir de 2000, se ha iniciado la evaluación, en parcelas comerciales, de la diversidad y abundancia de los artrópodos no diana asociados al cultivo del maíz-Bt comercializado en España (Compa-CB) y al cultivar isogénico (Dracma). Los depredadores son una componente importante en las interacciones tróficas presentes en los campos de maíz. Los ensayos en curso, en condiciones de campo y laboratorio, pretenden establecer el nivel de riesgo (directo o indirecto a través de las presas) al que están sometidos los depredadores más representativos. Los muestreos visuales han mostrado que *Orius spp.* y arañas son los depredadores más abundantes en la planta de maíz. Los carábidos y arañas son los depredadores polífagos más abundantes capturados en las trampas de gravedad.

Basically, this procedure preserves genetic variation in isofemale lines and concentrates the resistance alleles in homozygous genotypes where they can be detected using discriminating doses of the toxin.

Changes in susceptibility have been examined by annual monitoring of both species of corn borer on Bt maize fields located in the same geographical areas. A standardized bioassay has been set up to determine their susceptibility to Cry1Ab toxin by probit analysis.

Experiments in commercial fields have been initiated in 2000 to assess the diversity and abundance of beneficial arthropods on the Bt maize hybrid cultivated in Spain (Compa CB) and its isogenic cultivar (Dracma). Predators are an important component of trophic interactions found in maize fields. Ongoing field and laboratory experiments will allow to establish the level of risk (directly or indirectly via their prey) imposed by Bt-maize on predators. Visual surveys reveal that Orius spp. and spiders were the most abundant predators on the maize plants. Ground beetles and spiders were the most abundant polyphagous predators recorded in pitfall traps in all treatments.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- INIA, SC98-046-C3-3 (1998-2001)
- M^o Medio Ambiente (1999-2002)
- CSIC/CITMA, 2001CU0016 (2001-2002)
- CICYT, AGL2001-1652-C02-01 (2001-2004)
- PETRI, PTR1995-0612-OP (2002-2004)
- INIA, RTA 02-100-C3-2 (2002-2004)
- EU, QLK3-CT-2002-01969 (2002-2004)

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

- Caballero, C., Castañera, P., Ortego, F., Fontana, G., Pierro, P., Savona, G., and Rodríguez, B. (2001) Effects of ajugarins and related neoclerodane diterpenoids on feeding behavior of *Leptinotarsa decemlineata* and *Spodoptera exigua* larvae. *Phytochemistry* 58, 249-256.
- Ortego, F., Novillo, C., Sánchez-Serrano, J.J., and Castañera, P. (2001) Physiological response of Colorado potato beetle and beet armyworm larvae to depletion of wound-inducible proteinase inhibitors in transgenic potato plants. *J. Insect Physiol.* 47, 1291-1300.
- Sánchez-Ramos, I., and Castañera, P. (2001) Acaricidal activity of natural monoterpenes on *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), a mite of stored food. *J. Stored Prod. Res.* 37, 93-101.
- Sánchez-Ramos, I., and Castañera, P. (2001) Development and survival of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) at constant temperatures. *Environ. Entomol.* 30, 1082-1089.
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castañera, P., and Sánchez-Serrano, J.J. (2001) Hydroperoxidase lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 8139-8144.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Alfonso-Rubí, J., Ortego, F., Castañera, P., Carbonero, P. and Díaz, I. (2003) Transgenic expression of trypsin inhibitor Cme from barley in indica and japonica rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Trans. Res.* (en prensa/in press).
- Rodríguez, B., Caballero, C., Ortego, F., Castañera, P. (2003) A new tetranortriterpenoid from *Trichilia havanensis*. *J. Nat. Prod.* (en prensa/in press).
- Hernández, C.A., Pujol, M., Alfonso-Rubí, J., Armas, R., Coll, Y., Pérez, M., González, A., Ruiz, M., Castañera, P., and Ortego, F. (2003) Characterization of digestive endoproteases from the rice water weevil, *Lissorhoptus brevisrostris* Suffrian (Coleoptera: Curculionidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* (en prensa/in press).
- Sánchez-Ramos, I., and Castañera, P. (2003) Laboratory Evaluation of selective pesticides against the storage mite *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *J. Med. Entomol.* (en prensa/in press).



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

Jefe de Departamento
Department Head

RAMÓN B. RODRIGUEZ MARTÍNEZ

Profesores de Investigación

ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ

Investigadores Científicos

JOSÉ ANTONIO ABRISQUETA ZARRABE
ANTONIO MARTÍN GONZÁLEZ
CARLOS RODRÍGUEZ MURCIA

Científicos Titulares

ÁNGELA CASADO MORAGÓN
OFELIA GARCÍA HERMIDA
CONSUELO GONZÁLEZ MANCHÓN
ÁNGELES MARTÍN REQUERO
RAMÓN B. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Personal Técnico

M^ª AMPARO CERRAJERO HERNÁNDEZ
TOMÁS FONTELA CASADO
M^ª ENCARNACIÓN LOPEZ FERNÁNDEZ
M^ª CARMEN PÉREZ LAMIGUEIRO
M^ª JOSÉ TOBAJAS MARTÍN

Secretaria

MARIA VICTORIA LAFITA TOGORES

Fijación directa del N₂ *Direct N₂ Fixation*

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

M^a JOSÉ TOBAJAS MARTÍN (Hasta X-2001)
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Fijación del N₂, Biofertilizantes, Factores de crecimiento, Antioxidantes

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

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

En estos últimos años se ha comercializado toda su producción. Con fecha 27 de junio de 2002 se ha recibido de la "Oficina de Transferencia de Tecnología del C.S.I.C." el Contrato de Licencia - Aplicaciones Magnéticas S.L. para proceder a la firma del porcentaje de beneficios para el C.I.B.

La nitrogenasa fue la enzima estudiada en el cultivo de bacterias fijadoras de N₂, como el antioxidante más complejo de la naturaleza, que fue el comienzo del estudio de una gran cantidad de antioxidantes de origen natural clasificados en función de su capacidad biológica y potencial antioxidante así como también del sinergismo y especificidad de todos ellos en función de su potencial Redox.

En forma paralela se han estudiado los biocatalizadores con propiedades antioxidantes, imprescindibles para completar la actividad frente a las variadas formas de radicales libres.

Algunos antioxidantes específicos consiguen incrementar el glutatión celular (GSH) hasta un 10%, aumentando al mismo tiempo su actividad biológica.

Keywords: N₂ Fixation, Biofertilizers, Grow agents, Antioxidant

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

Producción 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.

In the last few years, the whole production has been commercialised. The "Oficina de Transferencia de Tecnología del CSIC" received, on date June 27th 2002, the "Aplicaciones Magnéticas" License onrtract, which is in due negotiation, leading to a profit percentage for the CIB.

Nitrogenase was the enzyme chosen for analysis in nitrogen fixing bacteria cultures, since it is the most complex antioxidant found in Nature. This was the starting point that eventually led to the study of a variety of natural antioxidants, that were classified according their biological and antioxidant activity, as well as their synergism and specificity regarding their Redox potential.

Simultaneously, we studied bio-catalysers that presented antioxidant activity, which are crucial for a complete activity against the different free radical species.

Several specific antioxidants give rise to 10% increases in cellular glutathion (GSH), as well as to an augment in its biological activity.

Patentes / Patents

- Continúa el desarrollo y explotación de la patente "Fertilizante bacteriano y procedimiento de obtención". Empresa – CSIC financiada por la CE y la comercialización de los biofertilizantes. Pat. Nº 9500851 (España). La firma del contrato de colaboración entre la Empresa "Aplicaciones Magnéticas SL" y el C.I.B. recibido el 27 de junio del año 2002, será firmado en el año 2003.
-

Genética Humana *Human Genetics*

JOSÉ ANTONIO ABRISQUETA ZARRABE
Jefe de Grupo / Group Leader
CARLOS RODRÍGUEZ MURCIA (Hasta III-2002)
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

VITALINO ALLER RACIMO
MARIA ÁNGELES MARTÍN LUCAS
JUAN MENAYA FERNÁNDEZ
Investigadores Visitantes / Visiting Scientists

MARIA AMPARO CERRAJERO HERNÁNDEZ
ROSARIO DE ANDRÉS MONTES (Desde IX-2001)
MARIA CARMEN PÉREZ LAMIGUEIRO
Personal Técnico / Technicians



Palabras clave: Síndrome de Down, Cromosoma 21, Marcadores bioquímicos

Investigación genética del síndrome de Down

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

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

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

Keywords: Down syndrome, Chromosome 21, Biochemical markers

Genetic research on Down syndrome

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

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

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

Organismos Financiadores/Funding Agencies

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

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Abrisqueta, J.A. (2001) Células madre: inquietudes y esperanzas. *Rev. Soc. Int. Bioética* 6, 7-17.
- Abrisqueta, J.A. (2001) Perspectivas actuales de la genética humana. *Carthaginensis* 32, 265-280.
- Abrisqueta, J.A. (2001) Stem cells: uncertainties and expectations. *J. Int. Soc. Bioethics* 6, 73-83.
- Abrisqueta, J.A. (2002) Clonación vs. Fecundación. *Verdad y Vida*. 234, 307-316.

Contribuciones a Libros/Contributions to books

- Abrisqueta, J.A. (2002) Introducción. Ética y Genética. *Real Patronato sobre Discapacidad. Documentos* 60/2002, 7-8.
- Abrisqueta, J.A. (2002) Bioética y Medicina Genómica. Libro: *Bioética: un diálogo plural*. Universidad Pontificia Comillas Madrid, 123-129.
- Abrisqueta, J.A. (2002) Clonación humana y sus avatares. *Publicación del II Congreso Mundial de Bioética*. Gijón (Asturias), 61-66.

Artículos de divulgación/Press Articles

- Abrisqueta, J.A. (2001) Conoce tu genoma. *Diario* 16, 13 febrero. 8.
 - Abrisqueta, J.A. (2001) El genoma de todos. *Ecclesia*, 3039, 342-343.
 - Abrisqueta, J.A. (2002) Investigación genética sobre el síndrome de Down. *Madrigalia*. Marzo, 2-3.
 - Abrisqueta, J.A. (2002) Genes y factores ambientales. *SAP*. Marzo, 25.
-

Biomarcadores de Estrés Oxidativo y Procesos de Envejecimiento

Oxidative Stress Biomarkers and Aging Processes

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

M^{ra} ENCARNACIÓN LÓPEZ FERNÁNDEZ
Personal Técnico / Technician

ROCÍO RUIZ SÁNCHEZ (Desde XII-2000)
Becario Predoctoral / Graduate Student

Palabras clave: Síndrome de Down, Estrés oxidativo, Radicales libres, Envejecimiento, Cu/Zn superóxido dismutasa, catalasa, Glutathion peroxidasa, Glutathion reductasa, Malondialdehído

Keywords: Down syndrome, Oxidative stress, Free radicals, aging, Cu/Zn superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase, Glutathione reductase, Malondialdehyde

Biomarcadores del estrés oxidativo en el síndrome de Down

El síndrome de Down (SD) es una alteración genética asociada a la presencia de tres copias del cromosoma 21, y es uno de los defectos congénitos humanos más importantes, que ocurre en 1 de cada 700–1000 nacimientos. Los niños con síndrome de Down muestran una severa hipotonía, corta estatura, fisuras palpebrales oblicuas y epicanthus. El síndrome está asociado con retraso mental, desórdenes del sistema inmune y procesos autoinmunes. Envejecimiento prematuro y un incremento en la incidencia de leucemia y otros desórdenes hematológicos son comunes en individuos afectados, así como defectos cardiacos, alta susceptibilidad y algunos tipos de alteraciones endocrinas. Existen evidencias que muestran que los individuos con SD presentan un estrés oxidativo inusual. Este estrés oxidativo resulta de un exceso del enzima Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD), que está codificado en el cromosoma 21 región 21q22.1. Esta sobreexpresión del gen Cu/ZnSOD, debida a un efecto de dosis, puede perturbar el equilibrio de las especies reactivas de oxígeno en las células causando daño oxidativo en moléculas biológicas importantes, tales como ADN, proteínas y lípidos. Debido a que el desequilibrio enzimático en los individuos con SD puede ser clave en la patogénesis del síndrome, nosotros analizamos las actividades de Cu/ZnSOD, catalasa

Biomarkers of oxidative stress in Down syndrome

Down's syndrome (DS), a genetic abnormality associated with the presence of three copies of chromosome 21, is one of the most important human congenital diseases, occurring in 1 of 700-1000 live births. Most obvious among these are morphological defects such as hypotonia in the newborn, short stature and the epicanthic eyefolds which give rise to the eye shape characteristic of the syndrome. The disease is associated with mental retardation, immune system disorders, and autoimmune processes. Premature aging and an increase in the incidence of leukaemia and other haematological disorders are common in affected individuals, as well as cardiac defects, a high susceptibility to infections and several types of endocrine disorders. There are several lines of evidence showing that individuals with DS are under unusual oxidative stress. Oxidative stress may result from excess of the enzyme Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) that is encoded by a gene located on chromosomal region 21q22.1. This overexpression of the Cu/Zn SOD gene, due to gene dosage, may disturb the steady-state equilibrium of active oxygen species within the cells resulting in oxidative damage to biologically important molecules. Because the disturbance of antioxidant enzyme balance in individuals with DS can be a key to DS pathogenesis, we analysed activities of Cu/Zn

(CAT), glutation peroxidasa (GPx), glutatiomm reductasa (GR), que constituyen el principal mecanismo de protección enzimática frente a los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno, y valoramos, también, los niveles de malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación lipídica.

Radicales libres y envejecimiento

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

SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), that form the main enzyme protection mechanism against harmful effects of reactive oxygen species, and the levels of malondialdehyde (MDA), an end product of lipid peroxidation.

Free radical and aging

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

turados por la agresión de los RLO. Niveles elevados de MDA son indicativos de un alto estrés oxidativo. Los objetivos de este trabajo se centran en la determinación de dos enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y en la valoración de MDA. Estas determinaciones se realizan en pacientes con desordenes de envejecimiento y en profesionales que soportan elevados niveles de estrés.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- Fundación Rodríguez Pascual, (2000-2002)
- Fundación Inocente-Inocente, (2000-2003)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Casado, A., López-Fernández, M.E. (2001) Antioxidant enzyme levels in red blood cells from cataract patients. *Gerontology* 47, 186-188.
- Sabbatine, M., Bellagamba, G., Casado, A., Tayebaty, S.K., Venarucci, D., and Amenta, F. (2001) Protective effect of treatment with nicardipine on cerebrovascular tree of spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exper. Hipertensión*. 23, 143-155.
- Gil, P., Fariñas, F., Casado, A., and López-Fernández, M.E. (2002) Malondialdehyde: a posible marker of ageing. *Gerontology* 4, 209-214.
- Hernández-Torres, A., Ramón-Jiménez, J.R., Cuenca-Giralde, E., Casado, A., López-Fernández, M.E., Guillén, J., Chamorro, J.C., and Caballero, C. (2002) Disminución de los productos de lipoperoxidación producida por las aguas minero-medicinales bicarbonatadas sulfatadas. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 37, 10-11.

Contribuciones a libros/Contributions to books

- Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M.E., Chacón J.I., Ortiz de Urbina, D., and Venarucci, D. (2001) Determinaciones séricas de Alfafetoproteína (AFP) en mujeres con cáncer de mama. En: *Salud y género. La salud de la mujer en el umbral del siglo XXI*. Cristina Bernis ed. (Ed. Universidad Autónoma de Madrid) pp. 237-243.
-

Metabolismo y Patología Molecular *Metabolism and Molecular Pathology*

ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ
Jefe de Grupo / Group Leader

OFELIA GARCÍA HERMIDA
CONSUELO GONZÁLEZ MANCHÓN

ÁNGELES MARTÍN REQUERO
RAMÓN B. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

NORA VIVIANA BUTTA
Investigadora Contratada / Research Associate

MILAGROS FERRER ALDEA
SUSANA LARRUCEA BILBAO (Hasta II-2001)
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

SONIA ALONSO (Desde X-2001)
NATIVIDAD DE LAS CUEVAS MORENO
ELENA GARCÍA ARIAS-SALGADO (Hasta XII-2001)
GEMA MARTÍN (Desde VII-2001)
LIN-NAN-SEN (Hasta VI-2001)
B. Predoctorales / Graduate Students

MARÍA JOSÉ ARIAS-SALGADO ROSBY (Hasta V-2002)
TOMÁS FONTELA CASADO
Personal Técnico / Technician



Palabras clave: Enfermedades genéticas, Plaquetas, Hemostasia, Regulación transcripcional, Enfermedad de Alzheimer

Keywords: Genetic diseases, Platelets, Haemostasis, Gene transcription, Alzheimer disease

Fisiopatología y genética molecular de trastornos hemostáticos

Pathophysiology and molecular genetics of haemostatic disorders

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

Succintly, the research on this area aimed at: 1) functional characterization of cells obtained from patients suffering of pathological processes of interest; 2) to disclose the existence of genetic structural changes associated with human pathology and determine the relationship between the structural changes and the functional perturbations. For this purpose, we have cloned mutant genes involved in pathological processes and stu-

alteraciones funcionales, y a su expresión en sistemas heterólogos con el fin de analizar la capacidad funcional de las proteínas mutadas.

Se presta atención preferente a:

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

b) Los mecanismo(s) de activación plaquetaria. Este estudio comprende:

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

- Coexpresión del receptor de Fg y receptores de agonistas fisiológicos.

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

Clonación y caracterización estructural y funcional de genes humanos implicados en la función plaquetaria

El objetivo general de esta línea de trabajo es la identificación, aislamiento, y caracterización de proteínas implicadas en la función plaquetaria. Se ha prestado particular atención a la regulación de la expresión y función de la podocalicina humana. Este estudio comprende: 1) clonación y análisis funcional de la región promotora de este gen; 2) expresión heteróloga y análisis funcional; 3) estudio cuantitativo de la expresión de formas alternativas de "splicing" y su papel fisiológico; 4) producción de anticuerpos monoclonales y librerías de expresión para estudiar la interacción de podocalicina con otras proteínas.

De forma paralela se ha procedido a desarrollar los medios técnicos necesarios para el análisis funcional de plaquetas con sobreexpresión de podocalicina así como anulación (KO) de este gen. Con tal fin hemos generado ratones portadores del transgen humano de podocalicina en megacariocitos. De igual forma, se está procediendo a la anulación génica condicional en megacariocitos de ratón del gen de la podocalicina mediante el sistema Cre-LoxP. El desarrollo de estas herramientas de trabajo nos permitirá estudiar el efecto de la anulación selectiva de otras proteínas de importancia reguladora.

died 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 genetic molecular basis of haemostatic disorders, particularly thrombasthenias and macrothrombocytopenic syndromes.

b) Mechanism(s) of platelet activation. This study comprises:

- Genetic engineering of the human fibrinogen (Fg) receptor and its stable expression in established cell lines.

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

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

Molecular cloning and structural and functional characterization of human genes controlling the platelet function

In general terms, this line of research aims at identification, isolation, and characterization of proteins involved in controlling the platelet function. Particular attention has been paid to study the regulation of expression and function of the human podocalyxin. The latter study comprises: 1) molecular cloning and functional analysis of the regulatory region of this gene; 2) heterologous expression and functional analysis; 3) quantitative analysis of the expression of alternative splicing forms and their physiological significance; 4) production of resources, like murine monoclonal antibodies and phage display libraries to study the interaction of podocalyxin with other proteins.

The above mentioned studies were accompanied by a parallel development of the technical resources needed for the functional analysis of platelets overexpressing human podocalyxin or platelet lacking podocalyxin. For that purpose we have produced mice selectively expressing the human transgen in megakaryocytes. At the same time we are producing mice carrying a conditional (floxed) null allele of podocalyxin and transgenic mice expressing the recombinase Cre controlled by a megakaryocyte-specific promoter. The production of these research tools

Bases celulares y moleculares de la enfermedad de Alzheimer: Alteraciones extraneurales

El interés general de esta línea de trabajo es el estudio de las bases celulares y moleculares de procesos patológicos humanos, en especial los mecanismos de activación y transducción de señales generadas por receptores de superficie y su efecto sobre el control del metabolismo y de la homeostasis de Ca^{2+} y H^{+} . Hace unos años iniciamos un estudio encaminado a elucidar el papel de estos procesos en la enfermedad de Alzheimer, con la hipótesis de que pudiera ser una enfermedad sistémica: aunque los síntomas más aparentes de esta patología tienen lugar en el sistema nervioso central, sería posible encontrar manifestaciones fisiopatológicas en tejidos periféricos. Por tal razón, creamos un banco de células de origen hematopoyético (transformación linfoblástica de linfocitos B con virus de Epstein Barr) de enfermos diagnosticados de demencia de Alzheimer y controles sanos de la misma edad. El estudio de la homeostasis iónica realizado con este modelo experimental ha puesto de manifiesto que en la demencia de Alzheimer existen cambios significativos en la homeostasis de Ca^{2+} y de H^{+} que podrían estar implicados en la etiopatogenia de este proceso. Cambios de esta naturaleza en el "medio interno" celular pueden ser capaces de alterar tasas de expresión, procesamiento, solubilidad, y/o función de múltiples proteínas. En el curso de estos estudios pudimos detectar alteraciones en el pH intracelular y niveles citosólicos de Ca^{2+} asociados a una mayor actividad proliferativa de las células procedentes de pacientes de Alzheimer. En la actualidad estamos estudiando los mecanismos de control del ciclo celular en linfoblastos de enfermos de Alzheimer, en un intento de determinar posibles alteraciones que puedan servir como marcadores de la enfermedad. El interés de estos estudios radica en que pueden reflejar alteraciones de tipo neoplásico que se han detectado en el sistema nervioso de enfermos de Alzheimer. Pretendemos también determinar la especificidad de las posibles alteraciones que se detecten, utilizando líneas celulares derivadas de individuos afectados por demencia vascular, demencia mixta (vascular más Alzheimer) y otras demencias degenerativas (complejo Pick).

will allow the selective disruption of the podocalyxin gene in megakaryocytes as well as in any other cell by crossing mice carrying the conditional allele with mice expressing the recombinase Cre in the target tissue. The skills and resources obtained by using the Cre-loxP system will be beneficial for the functional analysis of other proteins of interest.

Cellular and Molecular Basis of Alzheimer's Disease. Relevance of extraneural studies

The general interest of our laboratory is the study of the cellular and molecular basis of human pathological processes, mainly the mechanisms of activation and signal transduction of membrane receptors and their influence on the Ca^{2+} and H^{+} homeostasis. A few years ago, we initiated a project aimed at elucidating the role of these processes in the etiology of Alzheimer disease (AD). We hypothesize that AD is a systemic disorder with more prominent neurological manifestations. For this purpose, we created a bank of cell lines by transforming lymphocytes from AD patients and age-matched individuals with the Epstein Barr virus. With this experimental model we revealed an altered Ca^{2+} and H^{+} homeostasis in lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia (AD) that could have an etiopathogenic significance. In the course of those studies it was consistently observed higher rates of proliferation of AD lymphoblasts. We are now investigating whether there is a dysfunction of cell division cycle in AD lymphoblasts that could be related to the cell cycle disturbances detected in brain, associated with neuronal loss. We will try to study the specificity of the observed changes in cell lines derived from AD patients by comparison with cell lines from patients suffering from vascular dementia, mixed dementia and other neurodegenerative dementias (Pick's disease).

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- AECl, 1999CN0009 (1999-2001)
- CAM, 08.4/0015 (2001-2002)
- DGICYT, PM99-0095 (2001-2002)
- DGICYT, SAF 2000-0127 (2000-2002)
- DGICYT, SAF 2000-012 (2000-2003)
- FIS, 01/1194 2001-2003
- FIS, PI021263 (2002-2004)
- AECl, 2002CN0004 (2002-2004)

Tesis doctorales/Doctoral Theses

- Elena García Arias-Salgado. Fisiopatología del receptor plaquetario de fibrinógeno. Universidad Complutense de Madrid, 2001.
Director: Dr. Roberto Parrilla

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Arias-Salgado, E.G., Butta, N., González-Manchón, C., Larrucea, S., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2001) Competition between normal [674C] and mutant [674R]GPIIb subunits. Role of the molecular chaperon BiP in the processing of GPIIb-IIIa complexes. *Blood* 97, 2640-2647.
- Butta, N., González-Manchón, C., Arias-Salgado, E.G., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2001) Cloning and functional characterization of the 5'-flanking region of the human mitochondrial malic enzyme gene. Dual regulatory role of Sp1 and AP-2. *Eur. J. Biochem.* 268, 3017-3027.
- González-Manchón, C., Larrucea, S., Pastor, A.L., Butta, N., Arias-Salgado, E.G., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2001) Compound heterozygosity of the GPIIb gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Thrombosis and Haemostasis* 86, 1385-1391.
- Martín-Requero, A., Urcelay, E., Butta, N., Ciprés, G., Daza, F.J., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2001) Characterization of the hepatic α -adrenergic responsiveness. Influence of hormonal status. *Recent. Res. Develop. Endocrinol.* 2, 419-439.
- Urcelay, E., Ibarreta, D., Parrilla, R., Ayuso, M.S., and Martín-Requero, A. (2001) Enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia associated with calmodulin-dependent activation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Neurobiol Dis.* 8, 289-298.
- Arias-Salgado, E.G., Tao, J., González-Manchón, C., Butta, N., Vicente, V., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2002) Nonsense mutation in exon-19 of GPIIb associated with thrombasthenic phenotype. Failure of GPIIb(D597-1008) to associate with GPIIIa. *Thrombosis and Haemostasis* 87, 684-691.
- Jiang, M., Spicher, K., Boulay, G., Martín-Requero, A., Dye, C., Rudolph, U., and Birnbaumer, L. (2002) Mouse gene knock-out

and knock-in strategies and methods as applied to the α -subunits of the G1/G0 family of G-proteins. *Methods in Enzymology* 344, 277-298.

- Larrucea, S., González-Manchón, C., Butta, N., Arias-Salgado, E.G., Shen, L., Ayuso M.S., and Parrilla, R. (2002) Agonist-induced aggregation of CHO cells coexpressing the human receptors for fibrinogen (integrin α IIb β 3) and the platelet activating factor. Dissociation between adhesion and aggregation. *Blood* 99, 8-17.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Cuevas, N., Urcelay, E., Hermida, O.G., Saiz, R., Bermejo, F., Ayuso, M.S., and Martín-Requero, A. (2003) Ca²⁺/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements, pRb and P27KIP1 involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiol. Dis.* (en prensa/in press)
 - González-Manchón, C., Arias-Salgado, E.G., Butta, N., Martín, G., Rodríguez, R.B., Kaplan, C., Parrilla, R., and Favier, R. (2003) A novel homozygous splice junction mutation in GPIIb associated with alternative splicing, nonsense-mediated decay of GPIIb-mRNA, and type II Glanzmann's thrombasthenia. *Thrombosis and Haemostasis.* (en prensa/in press)
-



Departamento de Estructura y Función de Proteínas

Department of Protein, Structure and Function

Jefe de Departamento
Department Head

PALOMA LÓPEZ GARCÍA (Desde V-2001)
EDUARDO RIAL ZUECO (Hasta V-2001)

Profesores de Investigación

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

Investigadores Científicos

SANTIAGO LAMAS PELÁEZ
PALOMA LÓPEZ GARCÍA
ANTONIO ROMERO GARRIDO

Científicos Titulares

JAVIER CANADA VICINAY
M^ª ROSA LOZANO PUERTO
OSCAR LLORCA BLANCO
M^ª DOLORES PÉREZ-SALA GOZALO
EDUARDO RIAL ZUECO
GERMÁN RIVAS CABALLERO
LUIS I. RIVAS LÓPEZ

Personal Técnico

MARÍA TERESA ALDA LÓPEZ
M^ª ANGELES CORRALES GONZÁLEZ
CONCEPCION FERNÁNDEZ-CABRERA BAZÁN
MERCEDES JIMÉNEZ SARMIENTO
LUCAS OYA TARDIO
PILAR ZARAGOZA JIMÉNEZ
MERCEDES ZAZO GUIO

Secretaría

CARMEN PARTEARROYO LACABA

Biopatología de la Pared Vascular

Pathobiology of the Vascular Wall

Grupo1 / Group 1

SANTIAGO LAMAS

Jefe de Grupo / Group Leader

Investigador de Carrera / Staff Scientist

MARÍA MONSALVE PÉREZ (Desde IV-2002)

FERNANDO RODRÍGUEZ PASCUAL

CARLOS ZARAGOZA SÁNCHEZ

Investigadores Contratados / Research Associates

ANTONIO MARTÍNEZ RUIZ

Becario Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

ESTHER LÓPEZ RIVERA (Desde VII-2001)

F. JAVIER NAVARRO ANTOLÍN (Hasta V-2001)

ESTELA PINEDA MOLINA (Hasta IX-2002)

Becarios Predoctorales / Graduate Students

MARIANO REDONDO HORCAJO (Desde V-2002)

ESTRELLA SORIA LÓPEZ

Personal Técnico / Technicians

GRUPO 1

Palabras clave: Óxido nítrico, Endotelio, Expresión génica, Disfunción endotelial, Estrés oxidativo

Biopatología de la pared vascular

La integridad y función de la pared vascular es un proceso fundamental para la homeostasis del sistema cardiovascular. Estamos interesados en comprender los mecanismos moleculares de disfunción vascular en enfermedades como la arteriosclerosis y la diabetes, donde el daño vascular es una característica principal. Dentro de este amplio esquema estamos estudiando la regulación de la matriz extracelular por el óxido nítrico (NO), así como los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión del mediador vasoactivo endotelina-1 (ET-1).

Grupo2 / Group 2

M^ª DOLORES PÉREZ-SALA GOZALO

Jefe de Grupo / Group leader

KONSTANTINOS STAMATAKIS (Desde III-2001)

B. Predoctoral / Graduate Student

Grupos/Groups 1 y 2

EVA M^ª CERNUDA MOROLLÓN

B. Predoctoral / Graduate Student

M^ª JESÚS CARRASCO SOTO

Personal Técnico / Technician

GROUP 1

Pathobiology of the vascular wall

The integrity and proper function of the vascular wall is fundamental to the maintenance of cardiovascular health. We want to understand the molecular mechanisms of vascular dysfunction in conditions such as atherosclerosis and diabetes, where of the vascular wall vascular injury is a central feature of the disease. Within this broad theme, we are examining the regulation of the extracellular matrix by nitric oxide, and the transcriptional mechanisms regulating expression of the important vasoactive mediator endothelin-1.

The integrity is regulated by matrix metalloproteases (MMPs) Our recent work has demonstrated that NO increases expression of MMP-13 (collagenase-3) by endothelial cells via

La integridad de la pared vascular se regula por metaloproteasas (MMPs). Recientemente hemos demostrado que el NO aumenta la expresión de la MMP-13 en células endoteliales a través de un mecanismo que implica a GMPc y al factor de transcripción AP-1. En relación con la regulación de ET-1 por TGF- β , hemos observado que existe una cooperación entre AP-1 y las proteínas Smad de manera que contribuyen de forma coordinada al aumento de expresión de ET-1.

Nos hemos interesado asimismo por los procesos bioquímicos conocidos como S-glutacionilación y S-nitrosilación, promovidos por estrés oxidativo y nitrosativo. Hemos demostrado la modificación por S-glutacionilación de subunidades de AP-1 y NF- κ B, y consideramos que esta modificación puede representar un mecanismo importante de acoplamiento de señales de estrés oxidativo a la regulación de la expresión génica. En el momento actual estamos estudiando este fenómeno en células vivas. Para el estudio de la S-nitrosilación estamos desarrollando un abordaje proteómico en células endoteliales con el fin de detectar proteínas susceptibles de ser S-nitrosiladas en condiciones fisiológicas.

GRUPO 2

Palabras clave: Inflamación, Mediadores lipídicos, Aterosclerosis, Modificación postraduccional

Biología vascular

Las enfermedades cardiovasculares son las causas más frecuentes de mortalidad en países desarrollados. La compleja fisiopatología de estos trastornos implica una reacción inflamatoria y un aumento de la proliferación de las células de la pared vascular que compromete la integridad del vaso y el flujo sanguíneo. Uno de los factores desencadenantes de estas alteraciones es el aumento de los lípidos circulantes. Estamos interesados en el estudio del mecanismo por el cual diversos lípidos de la vía de síntesis de isoprenoides y de colesterol modulan la actividad y la expresión de proteínas implicadas en fisiopatología vascular, en concreto de proteínas de la familia de las Rho GTPasas, que regulan la dinámica y la proliferación celulares y la expresión de genes inflamatorios y mitogénicos.

Diversos metabolitos lipídicos y fármacos empleados en terapia cardiovascular pueden actuar como ligandos de factores de transcripción pertenecientes a la familia de receptores nucle-

a mechanism involving cGMP and the transcription factor AP-1. We have also demonstrated that AP-1 cooperates with Smad transcription factors to coordinate increased ET-1 expression in response to TGF- β .

Another element of the laboratory's effort concerns protein S-glutathionylation and S-nitrosylation induced by oxidative and nitrosative stresses. We have demonstrated S-glutathionylation of purified AP-1 and NF- κ B, and believe that this may represent an important mechanism coupling oxidative stress signals to the regulation of gene expression. We are now pursuing this in living cells. For the study of S-nitrosylation, we are developing a proteomics approach in endothelial cells to detect proteins susceptible to this modification under physiological conditions.

Group 2 Vascular Biology

Cardiovascular disease is the most important cause of mortality in westernized societies. The complex pathophysiology of these processes involves an inflammatory situation and an increased proliferation of the cells of the vascular wall, which compromises vessel integrity and blood flow. An important risk factor for cardiovascular disease is an increase in circulating lipids. We are interested in the mechanisms by which various lipids of the isoprenoid and cholesterol biosynthetic pathway modulate the expression and activity of proteins involved in vascular pathophysiology, in particular Rho GTPase family proteins, which participate in cell dynamics, proliferation and expression of proinflammatory and mitogenic genes.

Several lipid metabolites as well as some drugs used in the therapy of cardiovascular disease may act as ligands for the nuclear receptor family of transcription factors. We have studied the contribution of this mechanism to the regulation of inflammatory genes such as inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2. Prostaglandins are important lipidic mediators generated during the inflammatory response. Some prostaglandins which possess a cyclopentenone structure may covalently modify cellular proteins and modulate protein activity. Among the targets for this posttranslational modification we have identified transcription factor NF- κ B and H-Ras. These effects may contribute to the complex actions of these arachidonic acid metabolites on the inflammatory and proliferative processes of the vascular wall.

ares. Hemos estudiado la contribución de estos mecanismos al control de la expresión de genes inflamatorios como la óxido nítrico sintasa inducible y la ciclooxigenasa-2, responsables respectivamente de la generación de NO y prostaglandinas. Las prostaglandinas con estructura ciclopentenona pueden modular a su vez distintas vías de señalización mediante la modificación covalente de proteínas. Entre las proteínas que sufren este tipo de modificación postraduccional hemos identificado el factor de transcripción NF- κ B y las proteínas H-Ras. Estos fenómenos pueden contribuir a los efectos de estos metabolitos del ácido araquidónico sobre los procesos inflamatorios y proliferativos de la pared vascular.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- Programa FEDER, (MEC) 2FD97-1432 (1999-2001)
- Fundación Ramón Areces, (2000-2003)
- PNI, SAF 2000-149 (2000-2003)
- CAM, (2001-2002)
- Soc. Española Nefrología, (2001-2003)
- Fund. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) (2002)
- Instituto "Reina Sofía" de Investigaciones Nefrológicas (IRSIN)
- Merck, Sharp & Dohme, (2002)

Tesis Doctoral/Doctoral Theses

- Estela Pineda Molina. Regulación de la actividad de las proteínas c-jun y p50 por estrés oxidativo y nitrosativo a través de S-glutacionilación. Universidad Autónoma de Madrid, 2002. Director: Dr. Santiago Lamas

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Calles, B., Monsalve, M., Rojo, F., and Salas, M. (2001) A mutation in the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit that destabilizes the open complexes formed at the phage F29 late A3 promoter. *J. Mol. Biol.* 307, 487-497.
- Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., Cañada, F.J., and Pérez-Sala, D. (2001) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 inhibition of NF- κ B-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 35530-35536.
- De Paz, J.L., Angulo, J., Lassaletta, J.M., Nieto, P.M., Redondo-Horcajo, M., Lozano, R.M., Giménez-Gallego, G., and Martín-Lomas, M. (2001) The activation of fibroblast growth factor by heparin. Synthesis, Structure and Biological Activity of Heparin-like Oligosaccharides. *Eur. J. Chem. Biol.* 2, 673 - 685.
- González, B., Lamas, S., and Melián, E.M. (2001) Cooperation between Low Density Lipoproteins and IGF-1 in the Promotion of Mitogenesis in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* 142, 4852-4860.
- Martínez-Ruiz, A., García-Ortega, L., Kao, R., Lacadena, J., Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Davies, J., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J.G. (2001) RNase U2 and a-sarcin, a study of relationships. En "Ribonucleases". *Methods Enzymol.* 341, 335-351.
- Masip, M., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J.G. (2001) Arginine 121 is a crucial residue for the specific cytotoxic activity of the ribotoxin a-sarcin. *Eur. J. Biochem.* 268, 6190-6196.
- Navarro-Antolín, J., and Lamas, S. (2001) Nitrosative stress by Cyclosporine-A in the endothelium, studies with the NO-sensitive probe Diaminofluorescein -2/diacetate using flow cytometry. *Nephrol. Dial. Transpl.* 16, (Supp. 6), 1-4.
- Navarro-Antolín, J., López-Muñoz, M.J., Klatt, P., Soria, J., Michel, T., and Lamas, S. (2001) Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to Cyclosporine A. *FASEB J.* 15, 1291-1293.
- Navarro-Antolín, J., López-Muñoz, M.J., Klatt, P., Soria, J., Michel, T., and Lamas, S. (2001) Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to Cyclosporine A. *FASEB J.* 10, 1096/ fJ.00-0636 fje.
- Pérez-Sala, D., and Lamas, S. (2001) Regulation of Cyclooxygenase-2 expression by Nitric Oxide in cells. *Antiox. Redox Signal.* 3, 2 231-247.
- Pérez-Sala, D., Cernuda, E., Diaz-Cazorla, M., Rodríguez-Pascual F., and Lamas, S. (2001) Posttranscriptional regulation of the human inducible nitric oxide synthase by nitric oxide- cyclic GMP pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280, F466-F473.
- Pineda-Molina, E., and Lamas, S. (2001) Nitric oxide as a regulator of gene expression, Studies with the transcription factor proteins cJun and p50. *Biofactors* 15, (2-4), 113-5.
- Pineda-Molina, E., Klatt, P., Vázquez, J., Marina, A., García de Lacoba, M., Pérez-Sala D., and Lamas, S. (2001) Glutathionylation of the p50 subunit of NF- κ B, a mechanism for redox induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 40, 14134-14142.
- Stamler, J., Lamas, S., and Fang, F.C. (2001) Nitrosylation, The Prototypic Redox-Based Signalling Mechanism. *Cell* 106, 675-683, 2001.
- Hagedorn, M., Zilberberg, L., Lozano, R.M., Cuevas, P., Canron, X., Redondo-Horcajo, M., Giménez-Gallego, G., and Bikfalvi, A. (2001) A short peptide domain of platelet factor 4 blocks the angiogenic key events induced by FGF-2. *FASEB J.* 15, (3),550-62.
- Lozano, R.M., and Redondo-Horcajo, M., Jimenez, A., Zilberberg, L., Cuevas, P., Bikfalvi, A., Rico, M., and Giménez-Gallego, G. (2001) Solution Structure and Interaction with Basic Fibroblast Growth Factor of a 3 kDa Human Platelet-Factor-4 Fragment with Antiangiogenic Activity. *J. Biol. Chem.* 276, 38; 35723 - 35734.
- Cernuda-Morollón, E., Rodríguez-Pascual, F., Klatt, P., Lamas, S., and Pérez-Sala D. (2002) PPAR agonists amplify iNOS expres-

- sion while inhibiting NF- κ B, Implications for mesangial cell activation by cytokines. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2223-2231.
- Díez Marques, L., Ortega-Velázquez, R., Langa, C., Rodríguez-Barbero, A., López-Novoa, J.M., Lamas, S., and Bernabeu, C. (2002) Expression of endoglin in human mesangial cells, modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1587, (1), 36-44.
- Lamas, S. (2002) Los nefrólogos que elegimos el laboratorio. *Nefrología XXII* (2), 106-107.
- López-Ongil, M., Saura, C., Zaragoza, L., González-Santiago, M., Rodríguez-Puyol, C.J., and Lowenstein, D. (2002) Regulation of bovine endothelin-converting enzyme-1 by hydrogen peroxide, a possible role for acute phase/stat 3 transcription factor. *Free Radical Biol. Med.* 32, (5), 406-13.
- Lozano, R.M., Redondo-Horcajo, M., and Giménez-Gallego, G. (2002) Estructura tridimensional de un fragmento de 3 Kda del factor derivado de Plaquetas-4 con actividad antiangiogénica e interacción con el factor de crecimiento para fibroblastos. *An. Real Acad. Farm.* 68, 29-50.
- Navarro-Antolín, J., López-Muñoz, M.J., Soria J., and Lamas, S. (2002) Superoxide limits cyclosporine-A-induced formation of peroxynitrite in endothelial cells. *Free Radical Biol. Med.* 32, 702-711.
- Pérez-Sala, D., Cernuda-Morollón, E., Pineda-Mollina, E., and Cañada, F.J. (2002) Contribution of covalent protein modification to the antiinflammatory effects of cyclopentenone prostaglandins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 973, 533-536.
- Saura, M., Zaragoza, C., and Lowenstein, C.J. (2002) Smad-2 is a downstream signaling effector in the TGF- β -mediated endothelial nitric oxide synthase expression. *Circ. Res. Nov.* 1; 91(9), 806-13.
- Stamatakis, K., Cernuda-Morollón, E., Hernández-Perera, O., and Pérez-Sala, D. (2002) Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation, a novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 49389-49396.
- Zaragoza, C., Balbín, M., López-Otín C., and Lamas, S. (2002) Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-13 expression and activity in endothelium. *Kidney Int.* 61, 804-808.
- Zaragoza, C., Soria, E., López, E., Browning, D., Balbín, M., López-Otín, C., and Lamas, S. (2002) Activation of the MAP Kinase ERK 1,2 by the NO-cGMP-PKG Axis Regulates the Expression of Matrix Metalloproteinase-13 in Vascular Endothelial Cells. *Mol. Pharmacol.* 62 (4), 927-35.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Lamas, S., and Pérez Sala, D. (2001) Bases celulares y moleculares de la disfunción endotelial. HTA y Medicina Cardiovascular, Vol.1, pp 33-49. Ed. Scientific Communication Management, SL
- Klatt P., and Lamas, S (2002) Nitric oxide-activated glutathione Sepharose. *Methods Enzymol.* 359, 245-55.
- Klatt, P., and Lamas, S. (2002) c-Jun Regulation by S-Glutathionylation. *Methods Enzymol.* Vol. 348, 157-174.
- Pineda-Molina, E., and Lamas, S. (2002) S-Glutathionylation of NF- κ B Subunit p50. *Methods Enzymol.* Vol. 359, 268-279.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Ferrero, R., Rodríguez-Pascual, F., Jurado, D., and Torres, M. (2003) Biochemical and pharmacological characterization of the NO/cyclic GMP pathway in bovine chromaffin cells, physiological cGMP-mediated effects. *Rec. Res. Dev. Mol. Pharmacol.* (S.G. Pandalay, ed.) *Res. Signpost* (en prensa/in press).

Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores

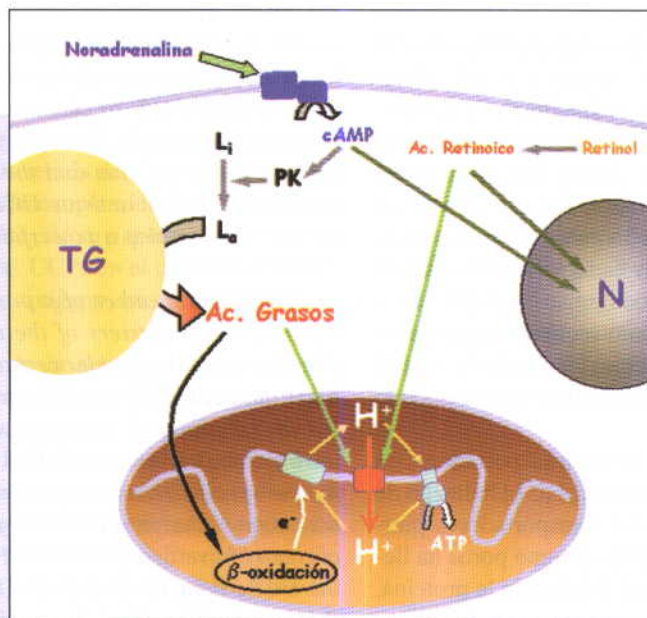
Mitochondrial Bioenergetics: Uncoupling Mechanisms

EDUARDO RIAL ZUECO
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

SUSANA CADENAS ALVÁREZ (Desde I a VIII-2001)
AMALIA LEDESMA FERNÁNDEZ
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

EKAITZ AGUIRREGOITIA MARCOS (Desde IX a XII 2002)
JESÚS JIMÉNEZ JIMÉNEZ
PAULA TOMÁS GARCÍA
B. Predoctorales / Graduate Students

PILAR ZARAGOZA JIMÉNEZ
Personal Técnico / Technician



Palabras clave: Mitocondria, Bioenergética, Proteína desacoplante, 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 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 del gradiente de protones se disipa en forma de calor.

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

El tejido adiposo pardo es un órgano termogénico presente en los mamíferos. La clave del mecanismo de producción de calor se encuentra en la proteína desacoplante UCPI. La UCPI se encuentra en la membrana interna mitocondrial y cuando es activada permite la re-entrada de los protones a la matriz disipando, por tanto, el gradiente de protones en forma de calor. La UCPI está regulada a dos niveles: por una parte en la expresión del gen y por otra en la actividad transportadora de protones. La expresión del gen es inducida tras la estimulación de receptores β -adrenérgicos, aunque las hormonas tiroideas y el ácido retinoico son también activadores de la transcripción. A nivel mitocondrial, su actividad se encuentra inhibida mediante nucleótidos de purina mientras que los ácidos grasos son activadores. Esta regulación tiene un gran sentido fisiológico ya que tras la estimulación noradrenérgica del adipocito pardo se va a estimular la lipólisis, se liberan ácidos grasos y éstos se van a oxidar en la mitocondria. Son estos mismos ácidos grasos los que van a activar la UCPI actuando, por tanto, como segundos mensajeros de la noradrenalina. Recientemente hemos demostrado que el ácido todo-trans retinoico es también un potente activador de la UCPI a nivel mitocondrial.

La UCPI es miembro de la familia de los transportadores de metabolitos de la membrana interna mitocondrial. El hallazgo de que bajo determinadas condiciones estos transportadores pierden su especificidad y actúan como canales o como poros ha llevado a la propuesta de la existencia, en el interior de la proteína, de un canal intrínseco inespecífico que se encontraría encubier-

Keywords: *Mitochondria, Bioenergetics, Uncoupling protein, 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 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 of the proton gradient can be dissipated as heat.

Thermogenesis in brown adipose tissue: the uncoupling protein UCPI

Brown adipose tissue is a thermogenic organ present in mammals. The key to mechanism of heat generation lies in the uncoupling protein UCPI. UCPI is a protein of the mitochondrial inner membrane that, when activated, catalyzes proton reentry into the matrix thus dissipating the proton gradient as heat. UCPI is regulated at two levels: gene expression and proton transport activity. Gene expression is potently activated by β -agonists although thyroid hormones and retinoic acid are also activators. At the mitochondrial level, the activity is inhibited by purine nucleotides and activated by fatty acids. This regulation has a deep physiological meaning. Noradrenergic stimulation of the adipocyte leads to an increased lipolysis that results in the release of fatty acids. These fatty acids play a dual role. They are substrate for oxidation and the cytosolic second messengers of noradrenaline that activate UCPI. We have recently shown that retinoic acid is also a powerful activator of UCPI at the mitochondrial level.

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

to tras dominios particulares que confieren a cada transportador sus propiedades específicas. Nuestro grupo está interesado en el análisis estructural y funcional de la proteína y en este momento tiene dos objetivos principales. En primer lugar, establecer los dominios de la UCP1 implicados en el control del transporte. En segundo lugar, localizar las regiones implicadas en la unión de los activadores y en particular el ácido retinoico.

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

En 1997 se describió la existencia de dos proteínas homólogas a la UCP1 y que se denominaron UCP2 y UCP3. Las dos proteínas se encuentran en humanos pero su distribución anatómica es diferente. La UCP2 se encuentra en muchos tejidos y órganos (adiposo pardo y blanco, músculo esquelético, riñón, pulmón, etc.) mientras que la UCP3 se encuentra exclusivamente en la musculatura esquelética y tejido adiposo pardo. Este descubrimiento levantó una gran expectación ya que ambas se encuentran en el hombre adulto y parecen responder a estímulos relacionados con la dieta. Su interés radica en que estas proteínas podrían ser la base molecular del mecanismo disipador de energía que permiten eliminar un exceso de calorías ingeridas en la dieta en humanos. Se habría abierto, por tanto, una nueva vía para el tratamiento de la obesidad, y de hecho, ambas proteínas son consideradas dianas terapéuticas. Recientemente se describió la existencia de proteínas homólogas a la UCP1 en animales que no son mamíferos e incluso en plantas. Esta amplia distribución sugiere que la regulación de la eficiencia de la fosforilación oxidativa mediante mecanismos de desacoplamiento es una estrategia de carácter general. Así, además de su papel termogénico, se ha propuesto la implicación de las UCPs en el control de la producción de especies reactivas del oxígeno, en el mantenimiento del balance redox, etc.

El estudio de la regulación de la actividad de la proteína desacoplante UCP2 se ha convertido desde el primer momento en un objetivo de nuestro grupo ya que no es activada por ácidos grasos como lo es la UCP1. La búsqueda de un posible activador dio resultado ya que demostramos que el ácido todo-trans retinoico activaba la respiración en mitocondrias de levaduras que expresaban UCP2 de modo recombinante. En contra con lo que ocurre con la UCP1, la UCP2 muestra una alta especificidad por el activador ya que de momento sólo el ácido todo-trans

identify the regions involved in the binding of the activating ligands and particularly retinoic acid.

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

In 1997 two proteins homologous to UCP1 were discovered and named UCP2 and UCP3. The two proteins are present in humans but their tissue distribution differs. UCP2 is found in many tissues and organs (white and brown adipose tissue, skeletal muscle, kidney, lung, etc.) while UCP3 is only expressed in brown fat and skeletal muscle. This discovery raised many expectations because the two proteins are present in the adult human and their expression levels seem to respond to diet related stimuli. Therefore, these proteins could be good targets for the development of new anti-obesity drugs. Recently, new homologues of the UCP1 have been described not only in animals that are non-mammalian but also in plants. The ubiquitous presence of the uncoupling proteins suggests that regulation of the efficiency of oxidative phosphorylation through physiological uncoupling may be a general strategy. Thus, in addition to their thermogenic role, they are being suggested to participate in the control of the production of reactive oxygen species, the control of the redox balance, etc.

The investigation of the regulation of the activity of the UCP2 has become an area of interest of our research group since we found that fatty acids do not activate UCP2 under the conditions reported for UCP1. The search for an activator gave a positive result when we demonstrated that all-trans retinoic acid was activating mitochondrial respiration in yeasts that express recombinantly UCP2. In contrast to UCP1, UCP2 displays a high specificity towards the activating ligand and thus only all-trans retinoic acid and TTNPB are activators. Our group is currently working on the structural basis of this specificity. The final aim is the discovery of a specific UCP2 activator that could be used as an anti-obesity drug.

retinoico y el retinoide TTNPB han demostrado ser activos. Nuestro grupo trabaja en la actualidad en el estudio de las bases estructurales que determinan esta especificidad. El fin último es la localización de un activador específico de la UCP2 que se pueda utilizar como fármaco anti-obesidad.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- Human Frontiers Science Program, RG0307/1998-M (1998-2001)
- CICYT, BIO99-0870 (2000-2002)
- Allergan Sales slnc. (2000-2002)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Arechaga, I., Ledesma, A., and Rial, E. (2001) The mitochondrial uncoupling protein UCP1: a gated pore. *IUBMB Life* 52, 165-173.
 - Rial, E., and González-Barroso, M.M. (2001) Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1504, 70-81.
 - Ledesma, A., Arechaga, I., García-Lacoba, M., and Rial, E. (2002) Modelling the transmembrane arrangement of the uncoupling protein UCP1 and topological considerations of the nucleotide binding site. *J. Bioenerg. Biomembr* 34, 473-486.
 - Ledesma, A., García-Lacoba, M., and Rial, E. (2002) Protein family review: The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol.* 3, 3015.1-3015.9.
 - Tomás, P., Ledesma, A., and Rial, E. (2002) Labeling of the uncoupling protein UCP1 with retinoic acid: ubiquinone favors binding. *FEBS Lett.* 526, 63-65.
-

Biología Estructural de Proteínas *Structural Biology of Proteins*

GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO
Jefe de Grupo / Group Leader

FRANCISCO JAVIER CAÑADA VICINAY
ROSA M^a LOZANO PUERTO
JESÚS JIMÉNEZ BARBERO
JUAN MANUEL RAMÍREZ DE VERGER
ANTONIO ROMERO GARRIDO
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

NURIA ABOITIZ CANTALAPIEDRA
PATRICK D. GROVES (Desde XI-2002)
M. JOSÉ FEITO CASTELLANO (Desde I-2002)
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

MARÍA DE LOS ÁNGELES CANALES MAYORDOMO
MARÍA DEL CARMEN FERNÁNDEZ ALONSO
MARÍA FERNÁNDEZ LÓPEZ LUCENDO
CARLOS FERNÁNDEZ TORNERO (Hasta X-2002)
VÍCTOR GARCÍA APARICIO (Desde XI-2002)
SILVIA MARI (Desde XII-2002)
ÁLVARO RAMÓN GONZÁLEZ
MARIANO REDONDO HORCAJO (Hasta III-2001)
ISRAEL SÁNCHEZ FERNÁNDEZ (Desde IX-2002)
ELENA SANTILLANA HERAS (Desde IX-2002)
B. Predoctorales / Graduate Students



CONCEPCIÓN FERNÁNDEZ CABRERA
MERCEDES ZAZO GUÍO
Personal Técnico / Technicians

Palabras clave: Biología estructural, Resonancia magnética nuclear de proteínas, Cristalografía de proteínas, Ingeniería de proteínas, Diseño de fármacos

Keywords: Structural biology, Nuclear magnetic resonance of proteins, Protein crystallography, Protein engineering, Drug design

Las investigaciones del grupo “Biología estructural de Proteínas” están dirigidas fundamentalmente a tratar de determinar las bases estructurales de las actividades biológicas de las

The research of the group “Structural Biology of Proteins” is mainly focused in the study of the structural basis of the biological properties of proteins, with the goal of affording leads

proteínas, con el objetivo último de ofrecer pistas para el desarrollo de nuevos fármacos. En la mayor parte de los casos, una vez identificado el problema el trabajo del grupo comienza con el diseño y el desarrollo de procedimientos de síntesis y preparación de las proteínas a estudiar, de forma que resulten aptas para llevar a cabo estudios estructurales de alta resolución. A largo de estos desarrollos no es extraño que haya que acudir a la ingeniería de proteínas y a los estudios estructurales de baja/media resolución para los que tanto los laboratorios del grupo como el Centro están suficientemente equipados (centrifugación analítica, espectroscopía visible/ultravioleta de transmisión y fluorescencia, dicroísmo circular, espectrometría de masas, cromatografía de exclusión de alta eficiencia etc.). El grupo dispone también, o tiene libre acceso, a equipamiento clásico de química de proteínas (secuenciador de proteínas, analizador de aminoácidos, sintetizador de proteínas) y de purificación de proteínas (cromatógrafos de medio y alto rendimiento). El grupo tiene a su disposición un difractor de rayos X instalado en el Centro, es usuario regular de las instalaciones de sincrotrón de Europa, y tiene acceso a los espectrómetros de resonancia magnética nuclear (RMN) de la Universidad Complutense de Madrid (500 MHz), del Parque Científico de Barcelona (600 y 800 MHz) y de la Universidad de Santiago de Compostela (750 MHz). El grupo espera disponer también, en breve, de un espectrómetro propio de 500 MHz. El grupo tiene también capacidad de proceder a la síntesis de compuestos orgánicos sencillos.

Un primer foco de los trabajos de investigación del grupo lo constituye el estudio de las bases estructurales del reconocimiento molecular entre proteínas (lectinas y enzimas) y carbohidratos. Dentro de este apartado, el interés del grupo se ha centrado en los estudios estructurales de dominios de heveína, naturales y artificiales, y en los de su interacción con oligosacáridos de quitina. Parte de las investigaciones del grupo han ido dirigidas también a estudiar los procesos de reconocimiento entre galactosidasas y derivados de lactosa. El modelo molecular elaborado a partir de estos estudios constituye un gran avance en el conocimiento de las bases moleculares de este proceso de interacción, antes de que la etapa catalítica dé comienzo propiamente. El grupo está trabajando también en la puesta a punto de métodos de RMN para llevar a cabo estudios de interacción entre ligandos pequeños y receptores macromoleculares, con objeto de conocer los motivos estructurales y energéticos de

for new therapeutic developments. Once a research goal is established the research work of the group normally begins with the design and development of systems for production of the targeted protein in conditions suitable for high-resolution studies. These developments often require of protein engineering and low/medium resolution structural studies. These studies can be quite adequately carried out with the equipment available in either their laboratories or at the Center (analytical ultracentrifugation, visible/UV transmission and fluorescence spectroscopy, circular dichroism, mass spectrometry, high performance exclusion chromatography etc.). Our laboratories are also equipped, or have free access, to typical protein chemistry instruments (protein sequencer, amino acid analyzer, protein synthesizer) and protein purification equipments (medium and high performance liquid chromatography). The group has X-ray diffraction facilities at the Centre, and regular access to the European synchrotron services and NMR spectrometers of Universidad Complutense de Madrid (500 MHz), Parque Científico de Barcelona (600 and 800 MHz) and Universidad de Santiago de Compostela (750 MHz). The group expects to have its own 500 MHz NMR spectrometer in a next future. The group has also facilities for synthesizing small organic compounds.

One of the research focuses of the group are the molecular recognition processes between carbohydrates and proteins (lectins and enzymes). Within this general framework, an important research goal of the group has been the structural characterization of hevein domains, both natural and artificial, and the study of their interactions with chitin oligosaccharides. In addition, the group has been also interested in studying, at the molecular level, the interaction of lactose with the galactosidasas. The obtained molecular model formulated on the basis of these last studies have allowed to elucidate the molecular basis of the interaction between these compounds before the catalytic process itself takes place. An implementation of NMR methods to explore the interaction between small ligands and macromolecular receptors is being carried out. As leading examples of these studies, the recognition of mammalian galectins by lactose and their analogues, the specific interaction of cholera toxin with GM1 ganglioside mimickers, and the interaction of fibroblast growth factors with a set of polyanionic activators and inhibitors of its mitogenic activity may be quoted. This last research line overlaps with a, still alive old one of the group, aimed at establishing the structural basis of the inhibition/activation of

estos procesos de reconocimiento. Como ejemplo de estos estudios de interacción, pueden citarse el de las galectinas de mamífero con lactosas modificadas, el de la toxina del cólera con análogos del gangliósido GM1 y el del factor de crecimiento para fibroblastos con un grupo de polianiones que activan o inhiben, según los casos, su actividad mitogénica. Estos últimos estudios conectan de forma bastante directa con una línea de investigación de larga tradición del grupo, y que todavía se mantiene viva, centrada en el establecimiento de las bases estructurales de la inhibición/activación del factor de crecimiento para fibroblastos, una proteína implicada en un alto número de patologías importantes. El grupo está interesado también en caracterizar la estructura tridimensional de determinados factores de virulencia del *Streptococcus pneumoniae* y en el diseño, en base a estos estudios, de inhibidores de su actividad biológica. Como primera aproximación, se ha resuelto recientemente la estructura de un dominio de unión a colina (c-LytA) mediante difracción de rayos-X. Esta estructura representa un nuevo tipo de plegamiento proteínico. En la actualidad, el grupo ha pasado ya a la etapa del diseño de inhibidores de esta proteína. El grupo estudia en estos momentos también el enzima UDP-glucosa pirofosforilasa, un componente clave en la síntesis de la cápsula celular de todos los tipos capsulares del neumococo caracterizados hasta el momento. Las proteínas transportadoras de los factores de crecimiento análogos a la insulina son otro de los objetos de estudio del grupo. Se trata de una familia de polipéptidos involucrada también en numerosas patologías importantes. El grupo colabora con un número considerable de laboratorios españoles y extranjeros en proyectos, a veces muy diversos, no siempre relacionados con los objetivos de investigación del grupo.

fibroblast growth factor, a protein deeply involved in important pathologies, and at designing inhibitors of its mitogenic activity. The group is also interested in establishing the structural basis of the biological activities of certain virulence factors of Streptococcus pneumoniae and in designing inhibitors of these virulence factor activities, based on these studies. In a first approach, the three-dimensional structure of the choline-binding domain of LytA has been solved by X-ray diffraction. This structure has revealed as a novel protein fold. Based on these data the group is now proceeding to the design and testing of low molecular-mass inhibitors of this protein. The enzyme UDP-glucose pyrophosphorylase is also being studied. This protein seems a key component of the capsule synthesis process for all the pneumococcal strains characterized up to now. The group is also undertaking now the structural characterization of the insulin growth factor binding proteins, a family of polypeptides involved in numerous important physiological functions and pathologies. The group collaborates with many Spanish and foreign research laboratories in several other projects not directly related with its main research goals.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB97-1237 (1998-2001)
- DGICYT, BQU2000-1501-C01 (2000-2003)
- AAI HI 186, (2001-2002)
- CAM, (2001-2002)
- COST D13 PROGRAMME, (2001-2002)
- CICYT, BIO2001-1724 (2001-2004)

- HPRN-CT-2002-00173 (Desde IX-2002)
- HPRN-CT-2002-00251, (Desde IX-2002)
- COST, D25 PROGRAMME (Desde X-2002)
- MCYT, 2FD97-0519
- MCYT, 1999-0867

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- García-Herrero, A. Estudio por RMN del reconocimiento de carbohidratos por enzimas glicosidasas: Deformaciones geométricas de galactósidos en presencia de la β -galactosidasa de *Escherichia coli*. Univ. Autónoma de Madrid, 2002. Director: Dr. F. Javier Cañada
- Fernández-Tornero, C. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. Implications for rational drug design. Universidad Autónoma de Madrid, 2002. Premio Joseph Tormo 2002. Premio de la Academia de Doctores 2002. Directores: Drs. Guillermo Giménez-Gallego y Antonio Romero.
- Redondo Horcajo, M. La dimerización del Factor de Crecimiento para Fibroblastos Ácido y la activación de su actividad mitogénica por heparina. Universidad de Alcalá de Henares, 2002. Director: Dr. Guillermo Giménez-Gallego.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Ahzarem, O., Prieto, A., Leal, J.A., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2001) Chemical Structure of a polysaccharides isolated from the cell wall of *A. verruculosus* and *A. ruber*. *Carbohydr. Res.* 336, 325-328.
- Alonso-Plaza, J., Canales, A., Roldán, J., García-Herrero, A., Iturrino, L., Jiménez, M., Solís, D., Asensio, J.L., Cañada, F.J., Siebert, H.C., André, S., Gabius, H.J., and Jiménez-Barbero, J. (2001) NMR Investigations of Protein-Carbohydrate Interactions. Insights on the Bound Conformation of beta-Galactosyl Xyloses to Mistletoe Lectin and to Galectin-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1568, 225-236.
- Buche, A., Ellis, G., and Ramírez, J.M. (2001) Probing the binding site of 800-nm bacteriochlorophyll in the membrane-linked LH2 protein of *Rhodobacter capsulatus* by local unfolding and chemical modification. Evidence for the involvement of a bHis20 residue. *Eur. J. Biochem.* 268, 2792-2800.
- Carpintero, M., Fernández-Mayoralas, A., and Jiménez-Barbero, J. (2001) The conformational behaviour of fucosyl and carba-fucosyl mimetics in the free and in the protein bound state. *Eur. J. Org. Chem.* 681-689.
- Carpintero, M., Bastida, A., García-Junceda, E., Jiménez-Barbero, J., and Fernández-Mayoralas, A. (2001) Synthesis of Carba- and C-Fucopyranosides and their Evaluation as Fucosidase Inhibitors. Analysis of an Unusual Conformation Adopted by an Amino-C-fucopyranoside. *Eur. J. Org. Chem.* 4127-4135.
- Carvalho, A.L., Dias, J.M., Sanz, L., Romero, A., Calvete, J.J., and Romão, M.J. (2001) Purification, crystallization and identification by X-ray analysis of a prostate kallikrein from horse seminal plasma. *Acta Crystallogr. D* 57, 1180-1183.
- Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., Cañada, F.J., and Pérez-Sala, D. (2001) 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 35530-35536.

- Cuevas, P., Carceller, F., and Giménez Gallego, G. (2001) Fibroblast growth factors in myocardial ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning. *J. Cell. Mol. Med.* 5, 132-142.
- Cuevas, P., Carceller, F., Díaz, D., Reimers, D., Fernández, M., Lozano, R.M., González-Corrochano, R., and Giménez-Gallego, G. (2001) Abolished angiogenicity and tumorigenicity of rat glioma by 1-naphthalenemonosulfonate. *Neurosc. Lett.* 308, 185-188.
- De La Fuente J.M., Barrientos, A.G., Rojas, T.C., Rojo, J., Cañada, J., Fernández, A., and Penades, S. (2001) Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 40, 2257-2261.
- Del-Val, I., Hill, Jr., T., Llorente, J., Jiménez-Barbero, J., and Otero, C. (2001) A selective enzymatic synthesis of 6'galactosyl lactose by Pectinex Ultra SP in water. *Biotechnology Lett.* 23, 1921-1924.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2001) A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1020-1024.
- Guzmán-Casado, M., Cardenete, A., Giménez-Gallego, G., and Parody-Morreale, A. (2001) Myo-inositol hexasulphate and low molecular weight heparin binding to human acidic fibroblast growth factor: a calorimetric and FTIR study. *Int J. Biol. Macromol.* 28, 305-313.
- Hagedorn, M., Zibelberg, L., Lozano, R.M., Cuevas, C., Conron, X., Redondo-Horcajo, M., Giménez-Gallego, G., and Bikfalvi, A. (2001) A short peptide domain of platelet factor 4 blocks angiogenesis key events induced by FGF-2. *FASEB J.* 15, 550-552.
- Jiménez-Barbero, J., Demange, R., Schenk, K., and Vogel, P. (2001) Synthesis and Solution Conformational Analysis of 2,3-Anhydro-3-C-[(1S)-2,6-anhydro-1-deoxy-1-fluoro-D-glycero-D-gulo-heptitol-1-C-yl]-D-gulo-furanose: First Example of a Monofluoromethylene-linked C-Disaccharide. *J. Org. Chem.* 66, 5132-5138.
- Kreuger, J., Salmivirta, M., Sturiale, L., Giménez-Gallego, G., and Lindahl, U. (2001) Sequence analysis of heparan sulfate epitopes with graded affinities for fibroblast growth factors 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 276, 30744-30752.
- Lozano, R.M., Redondo-Horcajo, M., Jiménez, M.A., Zilberberg, L., Cuevas, P., Bikfalvi, A., Rico, M., and Giménez-Gallego, G. (2001) Solution structure and interaction with basic and acidic fibroblast growth factor of a 3 kDa human platelet-factor-4 fragment with antiangiogenic activity. *J. Biol. Chem.* 276, 35723-35734.
- Muñoz, J., García-Herrero, A., Asensio, J.L., Cañada, J., and Jiménez-Barbero, J. (2001) Conformational selection of non-hydrolyzable glycomimetics: the conformation of N,N'- di-acetyl thiochitobiose bound to wheat germ agglutinin. *JCS Perkin I*, 867-872.
- Paz, J.L. de, Angulo, J., Lassaletta, J.M., and Nieto, P.M., Redondo-Horcajo, M., Lozano, R.M., Giménez-Gallego, G., and Martín-Lomas, M. (2001) The activation of fibroblast growth factors by heparin: synthesis, structure, and biological activity of heparin-like oligosaccharides. *Chembiochem.* 2, 673-685.
- Prieto, A., Leal, J.A., Gómez-Miranda, B., Ahzarem, O., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2001) Structure of fungal polysaccharides isolated from *Hypocrea Gelatinosa*. *Carbohydr. Res.* 333, 173-178.
- Solís, D., González, L., Díaz-Mauriño, T., Bruix, M., Rico, M., Jiménez-Barbero, J., and Feizi, T. (2001) Carrier protein-modulated recognition of Man8 N-glycan by conglutinin. *Glycobiology* 11, 31-36.
- Solís, D., Jiménez-Barbero, J., Kaltner, H., Romero, A., Siebert, H.C., von der Lieth, C.W., and Gabius, H.J. (2001) Towards defining the role of glycans as hardware in information storage and transfer: basic principles, experimental approaches and recent progress. *Cell Tissues Organs* 168, 5-23.
- Wah, D.A., Romero, A., Gallego del Sol, F., Cavada, B.S., Ramos, M.V., Grangeiro, T.B., Sampaio, A.H., and Calvete, J.J. (2001) Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted Dioclea guianensis seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. *J. Mol. Biol.* 310, 885-894.
- Ahzarem, O., Prieto, A., Leal J.A., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2002) Fungal cell-wall galactomannans isolated from

- HPRN-CT-2002-00173 (Desde IX-2002)
- HPRN-CT-2002-00251, (Desde IX-2002)
- COST, D25 PROGRAMME (Desde X-2002)
- MCYT, 2FD97-0519
- MCYT, 1999-0867

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- García-Herrero, A. Estudio por RMN del reconocimiento de carbohidratos por enzimas glicosidasas: Deformaciones geométricas de galactósidos en presencia de la β -galactosidasa de *Escherichia coli*. Univ. Autónoma de Madrid, 2002. Director: Dr. F. Javier Cañada
- Fernández-Tornero, C. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. Implications for rational drug design. Universidad Autónoma de Madrid, 2002. Premio Joseph Tormo 2002. Premio de la Academia de Doctores 2002. Directores: Drs. Guillermo Giménez-Gallego y Antonio Romero.
- Redondo Horcajo, M. La dimerización del Factor de Crecimiento para Fibroblastos Ácido y la activación de su actividad mitogénica por heparina. Universidad de Alcalá de Henares, 2002. Director: Dr. Guillermo Giménez-Gallego.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Ahzarem, O., Prieto, A., Leal, J.A., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2001) Chemical Structure of a polysaccharides isolated from the cell wall of *A. verruculosus* and *A. ruber*. *Carbohydr. Res.* 336, 325-328.
- Alonso-Plaza, J., Canales, A., Roldán, J., García-Herrero, A., Iturrino, L., Jiménez, M., Solís, D., Asensio, J.L., Cañada, F.J., Siebert, H.C., André, S., Gabius, H.J., and Jiménez-Barbero, J. (2001) NMR Investigations of Protein-Carbohydrate Interactions. Insights on the Bound Conformation of beta-Galactosyl Xyloses to Mistletoe Lectin and to Galectin-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1568, 225-236.
- Buche, A., Ellis, G., and Ramírez, J.M. (2001) Probing the binding site of 800-nm bacteriochlorophyll in the membrane-linked LH2 protein of *Rhodobacter capsulatus* by local unfolding and chemical modification. Evidence for the involvement of a bHis20 residue. *Eur. J. Biochem.* 268, 2792-2800.
- Carpintero, M., Fernández-Mayoralas, A., and Jiménez-Barbero, J. (2001) The conformational behaviour of fucosyl and carba-fucosyl mimetics in the free and in the protein bound state. *Eur. J. Org. Chem.* 681-689.
- Carpintero, M., Bastida, A., García-Junceda, E., Jiménez-Barbero, J., and Fernández-Mayoralas, A. (2001) Synthesis of Carba- and C-Fucopyranosides and their Evaluation as Fucosidase Inhibitors. Analysis of an Unusual Conformation Adopted by an Amino-C-fucopyranoside. *Eur. J. Org. Chem.* 4127-4135.
- Carvalho, A.L., Dias, J.M., Sanz, L., Romero, A., Calvete, J.J., and Romão, M.J. (2001) Purification, crystallization and identification by X-ray analysis of a prostate kallikrein from horse seminal plasma. *Acta Crystallogr. D* 57, 1180-1183.
- Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., Cañada, F.J., and Pérez-Sala, D. (2001) 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 35530-35536.

- Cuevas, P., Carceller, F., and Giménez Gallego, G. (2001) Fibroblast growth factors in myocardial ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning. *J. Cell. Mol. Med.* 5, 132-142.
- Cuevas, P., Carceller, F., Díaz, D., Reimers, D., Fernández, M., Lozano, R.M., González-Corrochano, R., and Giménez-Gallego, G. (2001) Abolished angiogenicity and tumorigenicity of rat glioma by 1-naphthalenemonosulfonate. *Neurosc. Lett.* 308, 185-188.
- De La Fuente J.M., Barrientos, A.G., Rojas, T.C., Rojo, J., Cañada, J., Fernández, A., and Penades, S. (2001) Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 40, 2257-2261.
- Del-Val, I., Hill, Jr., T., Llorente, J., Jiménez-Barbero, J., and Otero, C. (2001) A selective enzymatic synthesis of 6'galactosyl lactose by Pectinex Ultra SP in water. *Biotechnology Lett.* 23, 1921-1924.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2001) A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1020-1024.
- Guzmán-Casado, M., Cardenete, A., Giménez-Gallego, G., and Parody-Morreale, A. (2001) Myo-inositol hexasulphate and low molecular weight heparin binding to human acidic fibroblast growth factor: a calorimetric and FTIR study. *Int J. Biol. Macromol.* 28, 305-313.
- Hagedorn, M., Zibelberg, L., Lozano, R.M., Cuevas, C., Conron, X., Redondo-Horcajo, M., Giménez-Gallego, G., and Bikfalvi, A. (2001) A short peptide domain of platelet factor 4 blocks angiogenesis key events induced by FGF-2. *FASEB J.* 15, 550-552.
- Jiménez-Barbero, J., Demange, R., Schenk, K., and Vogel, P. (2001) Synthesis and Solution Conformational Analysis of 2,3-Anhydro-3-C-[(1S)-2,6-anhydro-1-deoxy-1-fluoro-D-glycero-D-gulo-heptitol-1-C-yl]-D-gulo-furanose; First Example of a Monofluoromethylene-linked C-Disaccharide. *J. Org. Chem.* 66, 5132-5138.
- Kreuger, J., Salmivirta, M., Sturiale, L., Giménez-Gallego, G., and Lindahl, U. (2001) Sequence analysis of heparan sulfate epitopes with graded affinities for fibroblast growth factors 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 276, 30744-30752.
- Lozano, R.M., Redondo-Horcajo, M., Jiménez, M.A., Zilberberg, L., Cuevas, P., Bikfalvi, A., Rico, M., and Giménez-Gallego, G. (2001) Solution structure and interaction with basic and acidic fibroblast growth factor of a 3 kDa human platelet-factor-4 fragment with antiangiogenic activity. *J. Biol. Chem.* 276, 35723-35734.
- Muñoz, J., García-Herrero, A., Asensio, J.L., Cañada, J., and Jiménez-Barbero, J. (2001) Conformational selection of non-hydrolyzable glycomimetics: the conformation of N,N'- di-acetyl thiochitobiose bound to wheat germ agglutinin. *JCS Perkin I*, 867-872.
- Paz, J.L. de, Angulo, J., Lassaletta, J.M., and Nieto, P.M., Redondo-Horcajo, M., Lozano, R.M., Giménez-Gallego, G., and Martín-Lomas, M. (2001) The activation of fibroblast growth factors by heparin: synthesis, structure, and biological activity of heparin-like oligosaccharides. *Chembiochem.* 2, 673-685.
- Prieto, A., Leal, J.A., Gómez-Miranda, B., Ahzarem, O., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2001) Structure of fungal polysaccharides isolated from *Hypocrea Gelatinosa*. *Carbohydr. Res.* 333, 173-178.
- Solís, D., González, L., Díaz-Mauriño, T., Bruix, M., Rico, M., Jiménez-Barbero, J., and Feizi, T. (2001) Carrier protein-modulated recognition of Man8 N-glycan by conglutinin. *Glycobiology* 11, 31-36.
- Solís, D., Jiménez-Barbero, J., Kaltner, H., Romero, A., Siebert, H.C., von der Lieth, C.W., and Gabius, H.J. (2001) Towards defining the role of glycans as hardware in information storage and transfer: basic principles, experimental approaches and recent progress. *Cell Tissues Organs* 168, 5-23.
- Wah, D.A., Romero, A., Gallego del Sol, F., Cavada, B.S., Ramos, M.V., Grangeiro, T.B., Sampaio, A.H., and Calvete, J.J. (2001) Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. *J. Mol. Biol.* 310, 885-894.
- Ahzarem, O., Prieto, A., Leal J.A., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2002) Fungal cell-wall galactomannans isolated from

- Geotrichum spp., and their teleomorphs, Dipodascus and Galactomyces. *Carbohydr Res.* 337, 2347-51.
- Ahrazem, O., Prieto, A., Leal, J.A., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2002) Fungal cell wall galactomannan isolated from *Apodus deciduus*. *Carbohydr. Res.* 337, 1503-1506
- Asensio, J.L., Hidalgo, A., Cuesta, I., González, C., Cañada, F.J., Vicent, C., Chiara, J., Cuevas, G., and Jiménez-Barbero, J. (2002) Experimental evidences for the existence of non-exo-anomeric conformations in branched oligosaccharides: the Neomycin-B case. *Chem. Comm.* 2232-2233.
- Asensio, J.L., Hidalgo, A., Cuesta, I., González, C., Cañada, F.J., Vicent, C., Chiara, J., Cuevas, G., and Jiménez-Barbero, J. (2002) Experimental evidences for the existence of non-exo-anomeric conformations in branched oligosaccharides: NMR analysis of the structure and dynamics of aminoglycosides of the neomycin family. *Chem. Eur. J.* 8, 5228-5240.
- Bernardi, A., Jiménez-Barbero, J., Potenza, D., García-Herrero, A., Cañada, F.J., and Capell, A. (2002) Synthesis and Structural Studies on Second Generation Mimics of Ganglioside GM1. A Three-Dimensional View of their Interactions with Bacterial Enterotoxins by NMR and Computational methods. *Chem. Eur. J.* 8, 4597-4612.
- Carvalho, A.L., Sanz, L., Baretino, D., Romero, A., Calvete, J.J., and Romão, M.J. (2002) Crystal structure of a prostate kallikrein isolated from stallion seminal plasma: A homologue of human PSA. *J. Mol. Biol.* 322, 325-337.
- Cipolla, L., Forni, L., Jiménez-Barbero, J., and Nicotra, F. (2002) Fructose-derived scaffolds: molecular diversity from a single molecule. *Synthesis and conformational analysis.* *Chem. Eur. J.* 8, 3976-3983.
- De Frutos, O., Granier, T., Gómez-Lor, B., Jiménez-Barbero, J., Monge, L., Gutierrez-Puebla, E., and Echavarren, A. (2002) Synthesis and self association of syn-5, 10, 15 trialkylated truxenes. *Chem. Eur. J.* 8, 2879-2890.
- Domenech, J., Prieto, A., Gómez-Miranda, B., Leal, J. A., Ahzarem, O., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2002) Structure of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of three strains of *V. fungicola*. *Carbohydr. Polym.* 50, 209-212
- Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2002) Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: Insights into the dynamics of the active homodimer. *J. Mol. Biol.* 321, 163-173.
- Fernández-Tornero, C., Ramón, A., Fernández-Cabrera, C., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2002) Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the complete choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin. *Acta Crystallogr.* 58, 556-558.
- Fernández-Tornero, C., Ramón, A., Navarro, M.L, Varela, J., and Giménez-Gallego, G. (2002) Synthesis of proteins with disulfide bonds in *Escherichia coli* using defined culture media. *BioTechniques* 32, 1238-1242.
- García-Herrero, A., Montero, E., Muñoz, J., Espinosa, J., Vián, A., García, J.L., Asensio, J.L., Cañada, F.J., and Jiménez-Barbero, J. (2002) Conformational selection of glycomimetics at enzyme catalytic site: Experimental demonstration of the binding of distinct high energy distorted conformations of C-, S-, and O-glycosides by WT and E537Q *E. coli* beta-galactosidases. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4804-4810.
- Hawley, J., Bampos, N., Aboitiz, N., Jiménez-Barbero, J., López de la Paz, M., Sanders, J., Carmona, P., and Vicent, C. (2002) Investigation of the Hydrogen Bonding Properties of a Series of Monosaccharides by ¹H NMR and Infrared Spectroscopy in Aqueous Media. *Eur. J. Org. Chem.* 1925-1936.
- Jemth, P., Kreuger, J., Kusche-Gullberg, M., Sturiale, L., Giménez-Gallego, G., and Lindahl, U. (2002) Biosynthetic oligosaccharide libraries for identification of protein-binding heparan sulfate motifs. *J. Biol. Chem.* 277, 30567-30573.
- Jiménez Barbero, J., de Castro, C., Evidente, A., Molinaro, A., Parrilli, L., and Surico, G. (2002) O-specific chain structure of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas cichorii*. *Eur. J. Org. Chem.* 1770-1775.
- Jiménez-Barbero, J., Amat-Guerri, F., and Snyder, J. (2002) The solid state and solution conformation of agents that promote

- microtubule stabilization: Taxol, epothilone, eleutherobin, and biomimetics. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2, 91-122.
- La Mata, I., García, J.L., González, C., Menéndez, M., Bastida, A., Cañada, F.J., Jiménez-Barbero, J., and Asensio, J.L. (2002) The impact of R53C mutation on the three dimensional structure, stability and DNA-binding proteins of human HesX-1 homeo-domain. *Chem. BioChem.* 3, 726-740.
 - López de la Paz, M., Ellis, G., Pérez, M., Perkins, J., Jiménez-Barbero, J., and Vicent, C. (2002) Carbohydrate Hydrogen-Bonding Cooperativity. Intramolecular Hydrogen-Bonds and their Cooperative Effect on Intermolecular Processes. Binding to a Hydrogen-Bond Acceptor Molecule. *Eur. J. Org. Chem.* 840-855.
 - Mikkelsen, L., Hernáiz, M.J., Skrydstrup, T., and Jiménez-Barbero, J. (2002) Conformation of glycomimetics in the free and protein-bound state. Structural and binding features of the C-glycosyl analogue of the core trisaccharide D-Man-(1Æ3)-D-Man-(1Æ6)]-D-Man. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14940-14951.
 - Mikkelsen, L., Krintel, S., Jiménez-Barbero, J., and Skrydstrup, T. (2002) Application of the Anomeric Samarium Route for the Convergent Synthesis of the C-Linked Trisaccharide D-Man-(1-3)-Man-(1-6)]-D-Man and the Disaccharides Man-(1-3)-D-Man and D-Man-(1-6)-D-Man. *J. Org. Chem.* 67, 6287-6308.
 - Muñoz, E., López de la Paz, M., Jiménez Barbero, J., Ellis, G., Pérez, M., and Vicent, C. (2002) The Relevance of Carbohydrate H-Bonding Cooperativity Effects. A Cooperative 1,2-trans-diaxial-Diol and Amidoalcohol H-Bonding Array as an Efficient Carbohydrate - Phosphate Binding Motif in non polar media. *Chem. Eur. J.* 8, 1908-1914.
 - Pantoja-Uceda, D., Bruix, M., Varela, J., López-Lucendo, M.I.F., Giménez-Gallego, G., Rico, M., and Santoro, J. (2002) Assignment of 1H and 15N resonances and secondary structure of the recombinant RICC3 of 2S albumin storage protein from *ricinus communis*. *J. Biomol. NMR* 23, 331-332.
 - Pérez-Sala, D., Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., and Cañada, F.J. (2002) Contribution of covalent protein modification to the antiinflammatory effects of cyclopentenone prostaglandins. *Ann. N Y Acad. Sci.* 973, 533-536.
 - Sanz, J., Jiménez, M.A., and Giménez-Gallego, G. (2002) Hints of nonhierarchical folding of acidic fibroblast growth factor. *Biochem.* 41, 1923-1933.
 - Varela, J., Navarro Rico, M.L., Guerrero, A., García, F., Giménez Gallego, G., and Pivel, J.P. (2002) Identification and characterization of the peptidic component of the immunomodulatory glycoconjugate immunoferon®. *Methods & Findings* 24, 471-480.
 - Wah, D.A., Fernández-Tornero, C., Sanz, L., Romero, A., and Calvete, J.J. (2002) Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109 phosphorylcholine complex. *Structure* 10, 505-514.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Barrios, V., Carceller, F., Giménez-Gallego, G., Asín-Cardiel, E., and Cuevas, P. (2002) Spasmolytic effects of fibroblast growth factors on cerebral and coronary vessels. In *Fibroblast Growth Factor in the Cardiovascular System*. P. Cuevas. Ed. (Munich: Holzapfel Publishers).
- Cuevas, P., Carceller, F., Barrios, V., Asín-Cardiel, E., and Giménez-Gallego, G. (2002) Therapeutic angiogenesis with fibroblast growth factors: from animals to humans. In *Fibroblast Growth Factor in the Cardiovascular System*. P. Cuevas. Ed. (Munich: Holzapfel Publishers).
- Cuevas, P., Carceller, F., Martínez-Coso, V., Cuevas, B., Fernández-Ayerdi, A., Asín-Cardiel, E., and Giménez-Gallego, G. (2002) Role of fibroblast growth factors in the ischemic myocardium. In *Fibroblast Growth Factor in the Cardiovascular System*. P. Cuevas. Ed. (Munich: Holzapfel Publishers)
- Guzmán-Casado, M., Parody Morreale, A., and Giménez-Gallego, G. (2002) Interaction of acidic fibroblast growth factor with

- heparin, heparan sulfate and polyanions. In *Fibroblast Growth Factor in the Cardiovascular System*. P. Cuevas. Ed. (Munich: Holzapfel Publishers).
- Jiménez, M.A., Lozano, R.M., and Giménez-Gallego, G. (2002) Activation of fibroblast growth factors by heparin functional analogs. In *Fibroblast Growth Factor in the Cardiovascular System*. P. Cuevas. Ed. (Munich: Holzapfel Publishers).
- Jiménez-Barbero, J., Peters, T. (2002) NMR spectroscopy of Glycoconjugates (Weinheim, Alemania: Wiley-VCH).
- Jiménez-Barbero, J., Peters, T. (2002) trNOE Experiments. In *NMR spectroscopy of Glycoconjugates*, Jiménez-Barbero, J., Peters, T., Eds. (Weinheim, Alemania: Wiley-VCH).
- Siebert, H.C., Frank, von der Lieth, C.W., Jiménez-Barbero, J., Gabius, H.J. (2002) Hydroxyl Protons as Potent Source of Information on the Bound-State Conformation of Ligands In *NMR spectroscopy of Glycoconjugates*, Jiménez-Barbero, J., Peters, T., Eds. (Weinheim, Alemania: Wiley-VCH).

Artículos de divulgación/ Press Articles

- Jiménez-Barbero, J. (2002) La contribución de K. Wüthrich a las aplicaciones de la RMN para determinar la estructura 3D de proteínas. *Anales de Química*, 18-24.
- Jiménez-Barbero, J. (2002) Una Técnica para el diseño racional de fármacos. *LA RAZON*, 10 Octubre
- Jiménez-Barbero, J., and Giménez-Gallego, G. (2002) El estudio de los principales actores de la vida. *EL PAIS*, 16 Octubre, 37.
- Lozano, R.M., Redondo-Horcajo, M., and Giménez-Gallego, G. (2002) Estructura tridimensional de un fragmento de 3kDa del factor derivado de plaquetas-4 con actividad antiangiogénica e interacción con el factor de crecimiento para fibroblastos. *Anal. Real. Acad. Farm.* 68, 29-50.
-

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

PALOMA LÓPEZ GARCÍA
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigadora de Carrera / Staff Scientist

PILAR FERNÁNDEZ DE PALENCIA (Hasta XII-2001)
Investigadora Contratada / Research Associate

ALICIA DE LA FUENTE HERCE (Desde VI-2002)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

NIEVES GARCÍA QUINTANS
M^a DE LA LUZ MOHEDANO BONILLO
M^a LAURA WERNING (Desde X-2001)
B. Predoctorales / Graduate Students

M^a ANGELES CORRALES GONZÁLEZ
Personal Técnico / Technician

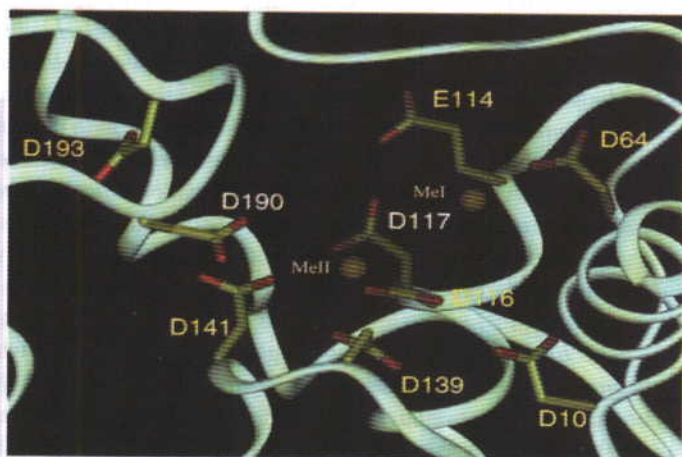


Figura: Modelo tridimensional del sitio activo del dominio nucleolítico de la DNA polimerasa I de *Streptococcus pneumoniae*. En el mecanismo propuesto para la actividad nucleásica intervienen 9 residuos conservados en nucleasas procarióticas y eucarióticas. Estos residuos circunvalan dos metales ionizados esenciales. El metal MeI estabiliza el estado de transición generado durante la reacción y el metal Me2 orienta el DNA sustrato en el centro activo para que sea hidrolizado.

Figure: 3D-Model of the active site of the nuclease domain from *Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I

I. The proposed reaction mechanism for the nuclease activity involves nine conserved acidic residues that accommodate two essential divalent metal ions. Metal MeI stabilize the generated transition state, and metal Me2 positions the DNA substrate for the cleavage.

Palabras clave: Bacterias lácticas, *Streptococcus pneumoniae*, Regulación de la expresión génica, Proteína fluorescente verde, DNA polimerasa I

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 ingeniería genética. La DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* (Spn PolI) posee actividades polimerásica y exonucleásica 5'-3'. Recientemente nuestro grupo ha realizado un análisis mutacional del dominio exonucleolítico de Spn PolI. El estudio realizado con proteínas mutantes en los residuos Asp10, Glu114 y Asp190 de Spn PolI y la predicción estructural de su dominio exonucleolítico apoyan el modelo catalítico presentado en la figura. Nuestros resultados han mostrado que el residuo Asp10 es indispensable para la catálisis y no es crítico para la coordinación de metales. Por tanto, el Asp10 podría ser esencial al actuar como una base general durante la reacción catalítica, activando una molécula de agua y generando el grupo hidroxilo requerido para el ataque nucleofílico. Para ello este residuo debería estar próximo al metal Me1 (como se infiere del modelo tridimensional de Spn PolI), pero no interaccionaría con él. El Glu114 está implicado en la unión del sustrato y en la catálisis. Por tanto podría contribuir a la extensa red de puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas que rodea a ambos metales, sin interaccionar con ninguno de ellos. Finalmente, el Asp190 es también un residuo esencial, implicado en unión al DNA y en la catálisis al coordinar el Me2 responsable de posicionar el sustrato en el centro activo.

Sistemas de detección y expresión para bacterias Gram-positivas

Esta línea se está desarrollando en colaboración con el grupo del Profesor Manuel Espinosa del CIB. Para establecer los sistemas de detección y expresión se empleó la proteína autofluorescente verde (GFP), codificada por el gen *gfp* de la medusa *Aequorea victoria* y el promotor inducible PM del gen neumocócico *malM*. La expresión de *malM* está regulada por el represor transcripcional MalR. Utilizando fusiones PM-*gfp* en combinación o no con el gen *malR* se han obtenido plásmidos

Keywords: Lactic acid bacteria, *Streptococcus pneumoniae*, Regulation of gene expression, Green fluorescent protein, DNA polymerase I

Characterization of DNA polymerase I from *Streptococcus pneumoniae*

The type I DNA polymerases are involved in DNA replication and repair processes and they are utilized in DNA manipulation techniques. The *S. pneumoniae* DNA polymerase I (Spn PolI) possesses polymerase and 5'-3' exonuclease activities. In this biennium our group has performed a mutational analysis of the nucleolytic domain of Spn PolI. The catalytic model presented in the figure is supported by the analysis of proteins containing mutations at residues Asp10, Glu114 and Asp190 of Spn PolI, and by the three-dimensional model of the nucleolytic domain of the protein. Our experimental results revealed that the Asp10 in Spn PolI is essential for catalysis and is not critical for metal coordination. Therefore, this residue could be essential by acting like a general base during the nucleolytic reaction, activating a water molecule and generating the hydroxyl group required for nucleophilic attack. For this purpose, Asp10 must be in close proximity to the metal ion bound to the putative Me1 site as shown by our nuclease domain model of the pneumococcal enzyme. Glu114 seems to be involved in substrate binding and catalysis, contributing to the extensive hydrogen-bonding/electrostatic network surrounding both metal ions, rather than interacting in a direct or indirect manner with any one of them. Asp190 is also an essential residue, being involved simultaneously in DNA binding and catalysis, and that its function is mediated by the coordination of Me2 at the active site.

Detection and expression systems for gram-positive bacteria

This line of research is been developed in collaboration with the group of Professor Manuel Espinosa (CIB). To establish the detection systems, we have utilized the green fluorescent protein (GFP) encoded by the *gfp* gene from *Aequorea Victoria* and the inducible promoter PM of the pneumococcal *malM* gene. The MalR transcriptional repressor regulates expression of *malM* gene. As expected, constructed recombinant plasmids carrying PM-*gfp* plus or without *malR* showed to confer inducible or constitutive levels of fluorescence to *Streptococcus pneumoniae*

recombinantes, que confieren niveles regulables o constitutivos de fluorescencia a *S. pneumoniae* y *Lactococcus lactis*. Hemos estandarizado, empleando células vivas la detección directa y cuantitativa de GFP en medios de cultivo. Así, nuestras construcciones pueden ser utilizadas tanto para sobre producir proteínas en *S. pneumoniae* y *L. lactis*, como para realizar estudios ecológicos de estas bacterias.

La utilización de estos sistemas en *L. Lactis* nos ha permitido sobre producir proteínas de interés industrial y establecer métodos de detección fluorescente de estirpes iniciadoras durante la elaboración de quesos. Estos estudios se han realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Carmen Peláez del Instituto del Frio (CSIC). Hemos desarrollado un nuevo método de transferencia conjugativa de *S. pneumoniae* a *L. Lactis*, que no requiere un marcador de selección en la estirpe receptora. Este método puede ser de interés general para transferir plásmidos conjugativos y mobilizables a estirpes lactocócicas de interés industrial refringentes a la electroporación. La aplicación de este método a la conjugación intergénica de *S. pneumoniae* a bacterias lácticas está siendo actualmente investigada en nuestro laboratorio. Utilizando este método hemos transferido plásmidos que codifican GFP a estirpes lactocócicas iniciadoras. El marcaje fluorescente ha permitido detectar la implantación de estas bacterias durante la elaboración de quesos mediante microscopía de fluorescencia convencional y confocal.

Por otra parte, utilizando los sistemas de sobreexpresión estamos caracterizando la regulación global mediada por un sistema de dos componentes (SDC) de *S. pneumoniae*, que es esencial para la viabilidad de este patógeno humano. La sobreproducción controlada del regulador del SDC nos ha permitido realizar un estudio proteómico de la respuesta de la bacteria frente a dicho estímulo. Los resultados obtenidos hasta el momento indican, que la expresión de las enzimas que catalizan toda la ruta biosintética de ácidos grasos está controlada por el SDC y sugieren que este sistema regula la fluidez de la membrana en respuesta a cambios ambientales o durante la replicación. Además el SDC regula los niveles de enzimas que permiten la síntesis de cofactores (como ATP y GTP) requeridos para reacciones energéticas. Estos estudios se están realizando en colaboración con el grupo del Dr. Jerry Wells del Institute of Food Research (Reino Unido) y se enmarcan dentro de un proyecto multinacional financiado por la Unión europea, que pretende

and *Lactococcus lactis*. We have also standardized quantitative detection of GFP in living cells during growth. Therefore, our constructions could be used for detection of gene expression in real time and overproduction of proteins in *L. lactis* and *S. pneumoniae* as well as to perform ecological studies of these bacteria.

The usage of these systems in *L. lactis* allowed us, in collaboration with the group of Dr. Carmen Peláez del Instituto del Frio (CSIC), to overproduce proteins of industrial interest and to establish methods of fluorescent detection of lactococcal starter strains during cheese-making. We have developed a new method of conjugative transfer from *S. pneumoniae* to *L. lactis*, which does not require a selective marker in the recipient strain. This method could be of general use for transfer of conjugative and mobilizable plasmids to lactococcal strains of industrial interest refringent to electroporation. The general application of this method to intergeneric conjugation from *S. pneumoniae* to lactic acid bacteria is currently under investigation. Using this method, we have transferred plasmids encoding GFP to lactococcal starter bacteria. The fluorescent tagging has allowed detection of implantation of these bacteria during cheese ripening by conventional fluorescence and confocal scanning laser microscopy.

Using the overexpression systems, we are also characterizing the global regulation mediated by an essential two component system (TCS) of *S. pneumoniae*. The controlled overproduction of the response regulator of the TCS in *S. pneumoniae* has allowed performing a proteomic study of the pneumococcal response to that stimulus. This study will be complemented with genomic analysis. The results obtained until now show that enzymes catalyzing the entire fatty acid biosynthetic pathway appear to be controlled by the TCS, suggesting that this system may regulate membrane fluidity in response to environmental changes or during replication. Additionally, the TCS regulates the level of enzymes that synthesize cofactors (i.e. ATP, GTP etc) for energy requiring reactions. These studies are being developed in collaboration with the group of Dr. Jerry Wells del Institute of Food Research (UK) and within the whole mark of a multinational research project founded by the European Union. This project aims to identify new genes and genes products essential for *S. pneumoniae* for developing of new anti-infective agents against this human pathogen.

identificar nuevos genes y productos génicos esenciales para *S. pneumoniae*, con el objeto de desarrollar nuevos agentes antiinfectivos contra dicho patógeno.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- UE-CICYT, FEDER 2FD-1025 (1999-2001)
- UE, QLRT-1999-30543 (2000-2003)
- CICYT, AGL2000-1530-C02 (2000-2004)
- CAM, 08.2/0051/2001 (2002-2004)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Amblar, M., García de Lacoba, M., Corrales, M.A., and López, P. (2001) Biochemical analysis of point mutations in the 5'-3' exonuclease of DNA polymerase I of *Streptococcus pneumoniae*: functional and structural implications. *J. Biol. Chem.* 276, 19172-19181

Artículos de Divulgación /Press Articles

- Fernández de Palencia, P., Nieto, C., Acebo, P., Espinosa, M., and López, P. (2001) *Streptococcus pneumoniae*: nuevas herramientas genéticas para estudiar un viejo patógeno. *Revista Ibérica* nº 446, pp. 545-547

Patente/Patent

- Nieto, C., Acebo, P., Fernández de Palencia, P., Corrales, M.A., Espinosa, M., and López, P. (2002). Procedimiento de obtención y detección de bacterias gram-positivas fluorescentes. Pat. española ES2166671.
-

Biología de Leishmania. Péptidos Antibióticos Eucarióticos

Biology of Leishmania. Eukaryotic Antibiotic Peptides

LUIS IGNACIO RIVAS LÓPEZ
JEFE DE GRUPO / GROUP LEADER
Investigador de Carrera / Staff Scientist

MARIA I. COLMENARES BRUNET (Desde XI-2001)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

JUAN ROMÁN LUCHE-ORTIGA
ESTHER GUERRERO POCUELO
JOSÉ MARÍA SALGADO CHIZ
B. Predoctorales / Graduate Students

Palabras clave: Leishmania/Péptido, Antibiótico/Estructura de Péptidos/Macrófago/DC-SIGN

Keywords: Leishmania/Antibiotic Peptide/Peptide Structure/ Macrophage/DC-SIGN

Péptidos antibióticos eucarióticos y sus análogos sintéticos

Eukaryotic antibiotic peptides and their synthetic analogues

Los péptidos antibióticos eucarióticos constituyen una primera barrera contra la invasión por patógenos. Su mecanismo de acción se basa en el reconocimiento específico de fosfolípidos ácidos expuestos en la membrana plasmática de procariotas y eucariotas inferiores, provocando su desorganización estructural y consiguiente permeabilización. Se ha incidido en el estudio de su actividad leishmanicida:

Eukaryotic antibiotic peptides play an important role as a first barrier against pathogen invasion. Most of them act by interaction with acidic phospholipids exposed at the outer leaflet of the plasma membrane from prokaryotes and lower eukaryotes, causing structural disorganization and subsequent permeabilization.

The advances on leishmanicidal activity for these peptides were:

A) Péptidos híbridos cecropina A-melitina

I) Determinación de la importancia de la estructuración en alfa-hélice del péptido híbrido cecropina A-melitina CA(1-8)M(1-18).- En colaboración con el Prof D. Andreu (Universitat Pompeu Fabra) y la Dra M^a Angeles Jiménez (Instituto Rocasolano), se ha determinado la estructura tridimensional de dicho péptido. En 16% TFE, su región N-terminal (8 primeros aminoácidos de cecropina A) permanece desestructurada; la región C-terminal, procedente de la melitina, forma una α -hélice, de importancia esencial en su actividad leishmanicida, ya que el diastereómero, [D]-Val16, Leu17-CA(1-8)M(1-18) totalmente desestructurado es cinco veces menos activo.

A) Cecropin A-melittin hybrid peptides

I) *Role of secondary structure on leishmanicidal activity of the cecropin A-melittin hybrid peptide CA(1-8)M(1-18). In collaboration with Prof D. Andreu (Universitat Pompeu Fabra) and Dr. M^a Angeles Jiménez (Instituto Rocasolano), the NMR structure of CA(1-8)M(1-18) has been determined in 16% TFE. Its N-terminal region, corresponding to the first eight residues from cecropin A, are unstructured, whereas the C-terminal half, corresponding to melittin, forms an amphipathic α -helix. The important role of this peptide structure on its leishmanicidal activity was evidenced as its fully unstructured diastereomer, [D]-Val16, Leu17-CA(1-8)M(1-18), is five times less active.*

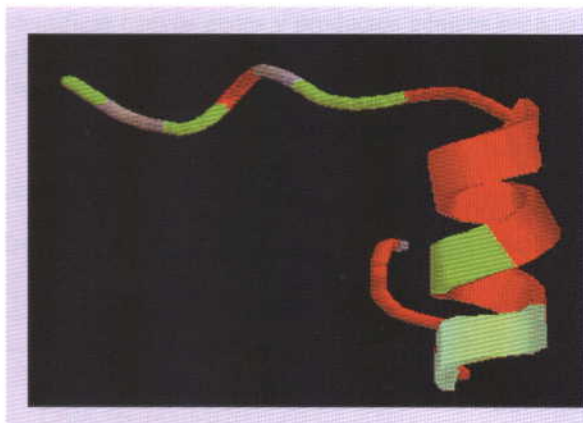


Figura 1: Estructura de CA(1-8)M(1-18) en 16% trifluoretanol. En color verde se representan los residuos polares y en rojo los hidrofóbicos (M^a Angeles Jiménez).

Figure 1: NMR structure of CA(1-8)M(1-18) in 16% TFE. Polar and hydrophobic residues are represented in green and red colours, respectively.

II) Determinación de las vías de transducción de señales en la inducción de NOS2 por CA(1-8)M(1-18) en la línea RAW 264.7. Se ha demostrado que la inducción de NOS2 por el péptido activa tanto NF- κ B, a través de su vía canónica, como AP-1, ambas vías son precisas para la inducción de NOS2, confirmado mediante su inhibición específica por dominantes negativos e inhibidores específicos. El estímulo inicial es provocado por la salida de ATP de la célula e intervención de los receptores purinérgicos, mecanismo extrapolable a una amplia variedad de péptidos activos en membrana.

III) Minimalización de estructuras, obtención de undecapéptidos activos. Se han obtenido análogos cecropina A-melitina de once residuos activos a concentración micromolar sobre *Leishmania*.

IV) Ensayos sobre otros patógenos. Se ha demostrado la actividad fungicida de CA(1-8)M(1-18) frente a diferentes hongos patógenos incluyendo *Candida albicans* (Dpto de Micología; C.N. de Microbiología, ISCIII). El mismo péptido se ha ensayado sobre aislados de *Acinetobacter baumannii*, una bacteria Gram negativa oportunista en UCIs., CA(1-8)M(1-18) fue bactericida a concentración micromolar sobre todos los aislados multirresistentes a los antibióticos habitualmente empleados en clínica.

B) Búsqueda de nuevas estructuras péptídicas leishmanicidas

Nuevos péptidos derivados de anfibios, ciclopentapéptidos estructurados como nanotubos, y γ -péptidos, poseen actividad leishmanicida a concentración micromolar. Excepto estos últi-

II) Signal transduction pathways involved in the NOS2 induction by CA(1-8)M(1-18) in RAW 264.7 cells. NF- κ B and AP-1 were activated by CA(1-8)M(1-18) in RAW transfected cells with a reporter gene under the proximal region of NOS2 promoter, as assessed by the used of dominant negative and specific inhibitors for both pathways. ATP release from the macrophage, triggered by peptide binding to macrophage surface, provides the initial stimulus, which activates purinergic receptors. This has been extended to a wide variety of membrane-active peptides.

III) Determination of the minimal length of cecropin A-melittin peptides for leishmanicidal activity. By screening of a large set of different peptides, undecapeptide analogues active against *Leishmania* at micromolar concentrations, were found; despite their short length, they act as well by a membrane permeabilization lethal mechanism.

IV) Microbicidal activities of cecropin A-melittin. CA(1-8)M(1-18) was active against a wide variety of pathogenic fungi and yeasts, including *Candida albicans* (collaborations with the Mycology Department, National Center for Microbiology, ISCIII) and on multiresistant *Acinetobacter baumannii*, an opportunistic Gram negative bacteria, causing severe bacteremias in immunocompromised patients.

B) Search for new lead leishmanicidal peptide structures

New analogues from Amphibian antibiotic peptides, cyclic pentapeptides forming nanotube structures and γ -peptides active at micromolar concentrations, were found and their mecha-

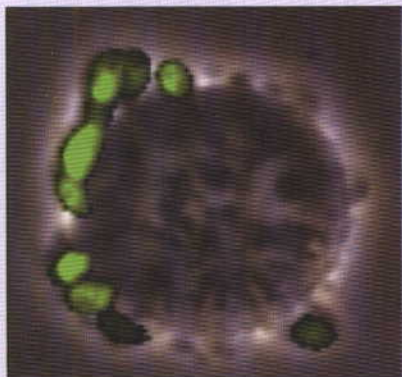


Figura 2: Amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi* marcados con CSFE unidos a células K562 transfectadas con DC-SIGN

Figure 2: CSFE labelled *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes bound to K562 cells transfected with DC-SIGN.

mos, todos actúan mediante permeabilización de la membrana del patógeno.

C) Expresión de péptidos exógenos en macrófagos

La expresión constitutiva de CA(1-8)M(1-18) y de HNP-1 en la línea macrofágica RAW 264.7 disminuye en más de un 50% la carga parasitaria de las células control. Su acción se basa en la eliminación de los parásitos, sin afectar su fagocitosis.

Lectinas tipo C en células dendríticas como receptores de *Leishmania*

En colaboración con el Dr. A. Corbí (CIB), se ha demostrado la participación de la lectina de tipo C DC-SIGN (CD209), un receptor panpatogénico presente en la superficie de las células dendríticas, en la entrada de amastigotes de *Leishmania* en dichas células. Anticuerpos contra DC-SIGN inhiben en un 60% la entrada del parásito, evidenciando la importancia de esta interacción dicho receptor en la iniciación de la respuesta inmune frente al parásito.

nism of action characterized. Except for the last group, all were active on membrane permeabilization.

C) Expression of exogenous antibiotic peptides in RAW 264.7 cells.

Constitutive expression of either CA(1-8)M(1-18) or the defensin HNP-1 in RAW cells decreased the number of intracellular Leishmania amastigotes by half, without modifying the initial rate of parasite phagocytosis.

C-type lectins as *Leishmania* receptors for dendritic cells

In collaboration with Dr. A. Corbí (CIB), we have demonstrated the involvement of DC-SIGN (CD 209), a panpathogen receptor at the surface of dendritic cells in the uptake of Leishmania amastigotes by these cells. AntiDC-SIGN antibodies inhibited by 60% amastigote binding, evidencing the importance of this receptor in the initial steps of the immune response against the parasite.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, (Red Estratégica de Biotecnología) (2000-2003)
- CAM, 08.2/0054/2001 2 (2001-2003)
- FIS, 99/0025-02 (2001-2003)
- EU, QLK2-CT-2001-01404 (2001-2004)

Publicaciones /Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Alarcón, T, López-Hernández, S., Andreu, D., Saugar, J.M., Rivas, L., and López-Brea, M. (2001) In vitro activity of CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide, against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Rev. Esp. Quimioter.* 14, 184-190.
- Chicharro, C., Granata, C., Lozano, R., Andreu, D., and Rivas, L. (2001) N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2441-2449.
- Luque-Ortega, J.R., Rivero-Lezcano, O.M., Croft, S.L., and Rivas, L.(2001) In vivo monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1121-1125
- Plasencia, I, Rivas, L., Casals, C., Keough, K.M, and Pérez-Gil, J. (2001) Intrinsic structural differences in the N-terminal segment of pulmonary surfactant protein SP-C from different species. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 129, 129-139.
- Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O.M., Corbí, A.L., and Rivas, L.(2002). Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania amastigotes*. *J. Biol. Chem.* 277, 36766-36769.
- Guirado, M., de Acs, I., Orta, T., Rivas, L., Terhorst, C., Zubiaur, M., and Sancho, J. (2002) Phosphorylation of the N-terminal and C-terminal CD3- ζ -ITAM tyrosines is differentially regulated in T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 574-581.
- Saugar, J.M., Alarcón, T., López-Hernández, S., López-Brea, M., Andreu, D., and Rivas, L. (2002) Activities of polymyxin B and cecropin A-melittin peptide CA(1-8)M(1-18) against a multiresistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 875-878.

Contribuciones a Libros/Contributions to books

- Andreu, D., and Rivas, L. (2002) Synthesis of antibiotic peptides In: *Peptide antibiotics: Discovery, Modes of Action and Applications*. C.J. Dutton, M.A. Haxell, H.A.I McArthur, R.G. Wax, eds. (New York: Marcel Dekker), pp 15- 46.

Próximos Artículos/ Forthcoming Articles

- Bayo, N., Jiménez, J.C., Rivas, L., Nicolás, E., Albericio, F.(2003) Solid-phase synthesis of the cyclic lipononadepsipeptide [N-mst(ser1), d-ser4,L-thr6, L-asp8, L-thr9] syringotoxin. *Chemistry*. 9, 1096-1103.

- Rivas, L. and Andreu, D. (2003) Cecropin-melittin hybrid peptides as versatile templates in the development of membrane-active antibiotics agents. In: Pore-forming peptides and protein toxins, G. Menestrina and M. Dalla Serra, eds. (Reading Berkshire Reino Unido: Harwood Academic Publishers), pp 215-259.
- Rivas, L., and Andreu, D. (2003) Péptidos antibióticos eucarióticos ¿una nueva alternativa en clínica? *Enf. Infecc. Microbiol. Clín.* (en prensa/in press).

Patentes/Patents

- Rivas, L. and Andreu, D 20 /07/2001, Nuevos péptidos acilados con actividad leishmanicida. 200101711.
 - Corbí, A., Rivas, L., Colmenares, M, and Relloso, M. 03/06/2002. Compuesto terapéutico frente a la infección por Leishmania y su uso. 200201436.
-

FtsZ y Tubulina: Bioquímica, Biofísica y Computación

FtsZ and Tubulin: Biochemistry, Biophysics and Computational Approaches

JOSÉ MANUEL ANDREU MORALES
Jefe de Grupo / Group Leader
JOSÉ FERNANDO DÍAZ PEREIRA
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

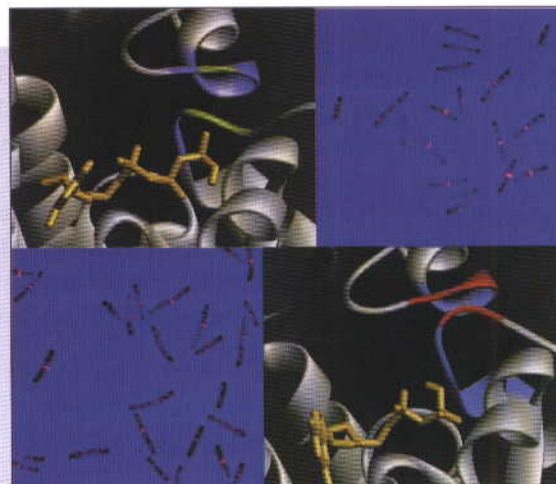
ANA MARIA GARCIA CARRIL (Desde VII-2002)
SONIA HUECAS GAYO (Desde IX-2001)
JUAN MANUEL PALACIOS (Hasta V-2001)
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

RUBEN MARTINEZ BUEY (Desde IX-2001)
MARÍA ANGELA OLIVA BLANCO
B. Predoctorales / Graduate Students

MARTÍN ALBA SÁNCHEZ (Desde I-2002)
Personal Técnico / Technician



Figura: FtsZ ensambla en el sitio de division celular bacteriana formando un anillo (como muestra en rojo la inmunofluorescencia). La unión del nucleotido a FtsZ controla su estado de activación modulando la estructura del bucle T3 de ésta. La FtsZ unida a GTP (arriba a la izquierda: esquema procedente de una simulación por dinámica molecular) ensambla formando filamentos rectos, mientras que la FtsZ con GDP (abajo a la derecha) forma filamentos con tendencia a curvarse. Un mecanismo semejante puede operar en tubulina. La hidrólisis de GTP puede provocar el paso de la forma recta a la curvada. Dichos movimientos pueden intervenir en la dinámica del anillo de FtsZ y eventualmente en la constricción del septo. Agradecemos las imágenes de *E. coli* a Sonsoles Rueda y Miguel Vicente, CNB-CSIC. Díaz et al (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 17307-17315



*Figure: FtsZ assembles into a ring at the site of bacterial cell division (shown in red after immunostaining). Nucleotide binding to FtsZ controls the activation of this protein by modulating the structure of switch loop T3, allowing GTP-bound FtsZ (top left: scheme from a molecular dynamics simulation) to assemble into straight filaments, while the GDP-containing FtsZ (bottom right) may assemble into curved ones. A related mechanism may operate in tubulin. These movements may work in the FtsZ ring dynamics and septum closure. We thank Sonsoles Rueda and Miguel Vicente, CNB-CSIC, for the *E. coli* images. Díaz J.F. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 17307-17315.*

Tanto las células eucarióticas como las procarióticas utilizan proteínas que ensamblan dinámicamente realizando funciones esenciales para la segregación de DNA, la división, la forma y la polaridad celulares. Algunas de ellas son proteínas del citoesqueleto que unen nucleótido y tienen estructuras homólogas, indicando que han evolucionado a partir de ancestros comunes. Así la tubulina, el componente principal de los microtúbulos del huso mitótico, y la FtsZ, que forma el anillo de septación que dirige la división celular bacteriana, comparten un mismo núcleo estructural, y constituyen una familia separada de GTPasas. Los microtúbulos son la diana de drogas antitumorales como el Taxol, y la FtsZ es una diana potencial de nuevos antibióticos. Ambas proteínas sufren ciclos de activación-desactivación, determinados por el nucleótido unido (GTP o GDP) a su sitio intercambiable. Nuestro trabajo consiste en la determinación de las interacciones funcionales de FtsZ y tubulina, empleando para ello métodos bioquímicos, biofísicos y bioinformáticos (si lo desea visite la página web de nuestro grupo <http://akilonia.cib.csic.es>).

Plegamiento, activación y ensamblaje de FtsZ. Estructura y dinámica de los polímeros de FtsZ

Las cadenas polipeptídicas desplegadas de FtsZ de arquea (*M. jannaschii*) y de bacterias (*E. coli*) son capaces de plegar espontáneamente, a diferencia la tubulina, que requiere la asistencia de chaperonina eucariótica para plegarse correctamente hasta su estado funcional nativo. Simulaciones de dinámica molecular y resultados de mutagenesis dirigida combinados con espectroscopía de fluorescencia, han indicado que la activación por GTP de FtsZ implica un cambio conformacional en el lazo T3 inducido por el fosfato gamma, que en la forma unida a GDP empujaría la hélice H8 del siguiente monomero de tubulina induciendo así el desensamblaje. La FtsZ ensambla en polímeros compuestos de unos pocos filamentos similares a los de tubulina, que se asocian entre sí de un modo diferente a los de los microtúbulos. Hemos propuesto que las extensas inserciones en los bucles de tubulina y su plegamiento asistido por chaperonas coevolucionaron con las interfases de contacto lateral responsables de la polimerización bidimensional necesaria para formar los microtúbulos. La estructura de los polímeros de FtsZ que forman el anillo-Z en las bacterias es todavía desconocida. Nuestros objetivos inmediatos consisten en determinar la estruc-

Both eukaryotic and prokaryotic cells use dynamic protein assemblies to perform central roles in DNA segregation, cell division, cell shape and polarity. Several of these assemblies are cytoskeletal fibres made of nucleotide binding proteins which have homologous frameworks, indicating that they have evolved from common ancestors. Thus tubulin, the main component of the microtubules of the mitotic spindle which segregates chromosomes, and FtsZ, which forms the septal ring directing bacterial cell division, share the same fold in two of their domains, and constitute a distinct family of assembling GTPases. Microtubules are a target for current antitumour drugs, such as Taxol, and FtsZ is an attractive target to screen for new antibiotics. These proteins undergo activation-deactivation cycles, determined by the GTP or GDP nucleotide bound to the exchangeable site. Our work focuses on the functional interactions of FtsZ and tubulin, employing biochemical, biophysical and computational approaches (visit our group web page at <http://akilonia.cib.csic.es>).

FtsZ folding, activation and assembly. Structure and dynamics of FtsZ polymers

*We have found that the isolated unfolded polypeptide chains of FtsZ from archaea (*M. jannaschii*) and bacteria (*E. coli*) are capable of spontaneous folding, in contrast with tubulin, which is known to require the assistance of eukaryotic chaperonin for correct folding into its native functional state. Molecular dynamics simulations and the results of site-directed mutagenesis combined with fluorescence spectroscopy, have indicated that the GDP/GTP activation switch of FtsZ involves a nucleotide gamma phosphate-induced change in the conformation of loop T3, which in the GDP-bound form may push against helix H8 of the next FtsZ monomer and induce disassembly. FtsZ assembles into polymers made of a few tubulin-like protofilaments, which associate in a distinct limited fashion. We have proposed that the extensive loop insertions of tubulin in the FtsZ/tubulin common fold and its chaperonin assisted folding coevolved with the lateral association interfaces responsible for extended two-dimensional polymerization into microtubule polymers. The structure of the FtsZ polymers forming the dynamic septal Z-ring in bacteria is unknown, since it has resisted electron microscopy. We currently aim to define the structure, energetics and dynamics of in vitro-assembled FtsZ polymers.*

tura, energética y dinámica de los polímeros de FtsZ ensamblados *in vitro*.

Mecanismos de activación de tubulina por biomiméticos de Taxol

Los mecanismos de activación de tubulina por GTP o Taxol son todavía poco conocidos. Los sitios de alta afinidad de Taxol solamente existen en los microtúbulos ensamblados y no en los dímeros aislados de alfa-beta-tubulina. La interacción Taxol-microtubulo era muy difícil de caracterizar, puesto que el ensamblaje y la unión están ligados. Hemos desarrollado un método para la evaluación de cualquier ligando que se una al sitio de unión del Taxol, empleando microtúbulos estabilizados frente al frío y la dilución, un derivado fluorescente de Taxol, y detección mediante polarización de fluorescencia. Con este método se ha estudiado la relación entre la estructura química y la afinidad para el sitio de unión de Taxol de un grupo de Epothilonas y se ha encontrado que la Laulimalida se une a los microtubulos en un nuevo sitio distinto del de Taxol. Esta tecnología patentada esta siendo utilizada para cribar una librería de extractos de organismos marinos, buscando nuevas sustancias que se unan al sitio de unión de Taxol. Simultáneamente estudiamos la manera en la que Taxol entra en los microtúbulos y los mecanismos de activación farmacológica (Taxol) y fisiológica (GTP) de tubulina, utilizando metodos *in silico* y de cinética rápida.

Mechanisms of tubulin activation by Taxol biomimetics

Our microtubule research has recently centered on the Taxol binding site. The high resolution activation mechanisms of tubulin by GTP or Taxol are poorly understood. High affinity Taxol binding sites only exist in assembled microtubules and not in isolated alpha-beta-tubulin dimers. It was very difficult to quantitatively study the Taxol-microtubule interaction since binding and the assembly are linked. If empty sites were assembled using relatively high concentrations of tubulin the high affinity of the ligand precluded a detailed characterization of chemical properties the binding site. We have developed a method for the evaluation of any ligand which binds to the Taxol binding site of microtubules, employing microtubules stabilized against cold and dilution, a fluorescent Taxol derivative and fluorescence polarization detection. The relationship between the chemical structure and the affinity fo the Taxol binding site of a group of Epothilone analogues has been studied; it has been found that Laulimalide binds to a new microtubule site distinct from Taxol. This patented technology is being used to screen a library of marine natural extracts for new compounds that bind to the Taxol binding site. We have characterized the fast kinetics of Taxol binding to microtubules. We are currently studying the entrance of Taxol into microtubules, and the mechanisms of pharmacological (Taxol) and physiological (GTP) activation of tubulin employing in silico and solution kinetic methods

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MCyT, BIO 1999-0859-c03-02 (1999-2002)
- MCyT, BIO 2000-0748 (2000-2002)
- CAM, Programa Grupos Estrategicos (2000-2003)
- PharmaMar SA (2001-2002)
- MCyT, BIO 2001-1725 (2001-2004)
- FPU, Programas FPI (2001-2005)
- CSIC, Programa i3p (2002-2003)

Publicaciones /Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Abal, M.A., Souto, A.A., Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2001) The centrosome and spindle pole microtubules are main targets of a fluorescent taxoid inducing cell death. *Cell Motil. Cytoskel.* 49, 1-15.
- Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2001) The interaction of baccatin III with the Taxol binding site of microtubules determined by a homogeneous assay with fluorescent taxoid. *Biochemistry* 40, 11975-11984.
- Díaz, J.F., Kralicek, A., Mingorance, J., Palacios, J.M., Vicente, M., and Andreu, J.M. (2001) Activation of cell division protein FtsZ: Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide gamma-phosphate. *J. Biol. Chem.* 276, 17307-17315.
- Andreu, J.M., Oliva, M.A., and Monasterio, O. (2002) Reversible unfolding of FtsZ cell division proteins from archaea and bacteria. Comparison with eukaryotic tubulin folding and assembly. *J. Biol. Chem.* 277, 43262-43270.
- Díaz, J.F., Barasoain, I., and Andreu, J.M. (2002) Fast kinetics of Taxol binding to microtubules. Effects of solution variables and microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* Published, JBC Papers in Press, Dec. 20, 2002. M211163200
- Encinas, M.V., Gonzalez-Nilo, F.D., Andreu, J.M., Alfonso C., and Cardemil, E. (2002) Urea-induced unfolding studies of free- and ligand-bound tetrameric ATP-dependent *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase. Influence of quaternary structure on protein stability. *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 645-656.
- Nicolaou, K.C., Ritzén, A., Namoto, K., Buey, R., Díaz, J.F., Andreu, J.M., Wartmann, M., Altman, K.H., O'Brate, A., and Giannakakou, P. (2002) Chemical synthesis and biological evaluation of novel Epothilone B and trans-12,13-Cyclopropyl Epothilone B analogues. *Tetrahedron* 58, 6413-6432.
- Pryor, D.E., O'Brate, A., Bilcer, G., Díaz, J.F., Wang, Y., Wang, Y., Kabaki, M, Jung, M.K., Andreu, J.M., Gosh, A.K., Giannakakou, P., and Hamel, E. (2002) The microtubule stabilizing agent Laulimalide does not bind in the taxoid site, kills cells resistant to Paclitaxel and Epothilones, and may not require its epoxide moiety for activity. *Biochemistry* 41, 9109-9115

Patentes/Patents

- Andreu, J.M., Díaz J.F., and Barasoain, I. (2001) Metodo de detección y evaluación de compuestos miméticos de paclitaxel 200101710; PCT/ES02/00262
-

Parasitología Molecular *Molecular Parasitology*

VICENTE LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ANA MARÍA ALONSO AYALA (Desde IX-2001)
SORAYA TALADRIZ MORENO (Hasta VIII-2001)
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

M. TOBIAS HANKE SCHAEFER
JESÚS RAMIRO IBÁÑEZ
B. Predoctorales / Graduate Students

ELENA SIERRA FILARDI (2002)
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: *L. infantum*, Vacunas recombinantes, leishmaniasis, DNA polimerasa beta, Topoisomerasa II, Replicación y Reparación del DNA

Keywords: *L. infantum*, Recombinant Vaccines, Leishmaniasis, DNA Replication and Repair, DNA Polymerase Beta, Topoisomerase II

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

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

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida por distintas especies del género *Leishmania*. Esta enfermedad, endémica en Asia, América y la zona Mediterránea tiene como huésped mamífero principal en Europa el perro. El porcentaje de infestación de los perros en España es del 10% aproximadamente con zonas de incidencia mucho mayor (hasta el 30%). Esta enfermedad está asociada en humanos con los pacientes inmunodeprimidos aunque su prevalencia está aumentando en personas inmunocompetentes. De acuerdo con los estudios llevados a cabo en el modelo murino, el desarrollo o la contención de la enfermedad esta relacionada con el proceso de presentación de antígeno y con el equilibrio entre las subpoblaciones Th1 y Th2. Así, la proliferación de células Th1 se correlaciona con la contención de la enfermedad y la de las células Th2 con el progreso de la misma.

*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 obtained the encoding gene of a protective antigen p36/LACK that induces high levels of protection against the infection at the murine model. The present research work being carried out at the Molecular Parasitology laboratory attempts the development of a recombinant vehicle to test its protective effect against the *L. infantum* infection in dogs as well as the determination of basic parameters of the CD4+ cells (Th1 and Th2) in the response against the experimental infection. The results obtained in the murine model have shown that p36/LACK*

Figura: Predicción de la estructura tridimensional de la DNA topoisomerasa II de *Leishmania infantum*.

Figure: Structure prediction for DNA topoisomerase II from *Leishmania infantum*.



Con el fin de intentar cortar el ciclo del parásito en el huésped principal se ha desarrollado una vacuna frente a la enfermedad en el perro. Para ello, se está utilizando el gen de una proteína del parásito análoga del receptor de proteína quinasa C activada (LACK) que denominamos p36/LACK. Se han llevado a cabo pruebas de protección cruzada en el modelo murino (Balb/c) y se han medido además los niveles de interleuquinas (IL-4/IFN gama) y la producción de anticuerpos específicos frente a la proteína p36/LACK (IgG1, IgG2a) con objeto de detectar el grupo celular que prolifera durante la infección experimental. Se han realizado experimentos con diferentes construcciones del gen de la p36/LACK que se ha utilizado bien "desnudo" o incluido en un virus vaccinia atenuado. Los resultados obtenidos han mostrado un nivel de protección muy superior a los proporcionados hasta ahora por extractos del parásito o por antígenos de la superficie del mismo (gp63). Los experimentos que se han llevado a cabo de protección en perros Beagle con objeto de determinar la capacidad de protección en el huésped mamífero del parásito en Europa han mostrado que la vacunación heteróloga con una vacuna recombinante conteniendo el gen LACK en un plásmido y un virus vaccinia inducen protección en un 60% de los casos frente a la infección y en un 80% de los casos frente a la clínica de la leishmaniosis utilizando una infección experimental un millón de veces superior a la infección natural. Se ha mostrado asimismo la implicación de las células CD 8+ en la

induces protection in higher levels than those induced by classical *Leishmania* extracts and parasite surface antigens (gp63). The protective effect of the LACK antigen has been tested in the european reservoir, the dog. A recombinant heterologous vaccination method based on a plasmid and a recombinant vaccinia virus containing the encoding gene for the LACK antigen is able to protect Beagle dogs against an experimental infection one million times higher than the natural infection. Under these conditions 60% of dogs were protected against the infection and 80% against the clinical signs of the disease. CD8+ cells seem to be involved in the immune response that correlate with protection.

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

The Trypanosomatidae display exceptional biological features such as polycistronic transcription, trans-splicing of precursor RNAs and transcriptional editing of mitochondrial RNAs. The chromatin does not condense into chromosomes and the

protección de los perros infectados. En estos momentos se está comenzando un experimento de campo para medir los niveles de protección frente a la infección natural.

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

Los Tripanosomátidos presentan funciones excepcionales como la transcripción policistrónica, el "trans-splicing" de los RNA precursores o la edición de los RNA mitocondriales. La cromatina no se condensa formando cromosomas y la membrana nuclear permanece durante la división celular. Las polinucleótido fosforilasas son una de las actividades enzimáticas que aparecieron más tempranamente en la evolución. El mecanismo de adición de nucleótidos está muy conservado entre las distintas polimerasas. Todas las estructuras enzimáticas descritas hasta ahora muestran una estructura similar del tipo "hand shape" con subdominios en la proteína denominados como "dedos", "palma" y "pulgar" preparadas para llevar a cabo su función con la molécula de DNA.

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

nuclear envelop remains during cell division. The polynucleotide phosphorilases are probably one of the earliest enzymatic activities appearing in evolution. Irrespective of the variety of DNA polymerases involved in the DNA replication and repair, they display several common features. There are also structural similarities between the different DNA dependent polymerases according to their crystal structures. The polymerization domain displays a hand shape structure with fingers, palm and thumb subdomains that define a groove to hold the DNA.

The DNA polymerase beta (Pol beta), a member of the family X of DNA polymerases, seems to participate in several DNA transactions in vivo, e.g. DNA replication, recombination and base excision DNA repair (BER). DNA synthesis that may be also catalyzed by Pol delta or Pol epsilon in addition to Pol beta. The average of Pol beta error rates are clearly higher than those determined for other DNA polymerases involved in DNA replication. This error-prone activity is higher for the alternative BER than for the simple BER mechanism. The functional meaning of this error-prone behaviour is not clear and several hypothesis have been proposed. Pol beta-like DNA polymerases may act as mutator agents as has been recently described for human Pol beta, or generating variability by addition of untemplated nucleotides at VDJ recombination intermediates, as it occurs with TdT. More recent data suggest that Pol beta could play a role in differentiation processes in mammals, i.e. in neurogenesis. L. infantum, as much of the Trypanosomatidae displays variability as a defense method gainst drug action. This causes most of the relapses in the treatment of the disease. The DNA polymerase beta from L. infantum has been identified and cloned. The expression of the encoding gene is regulated along the life cycle of the protozoon and correlates to the parasite infectivity. The recombinant protein has been obtained in soluble form after detergent solubilization and refolding under the proper solubilization conditions of the E.coli inclusion bodies. The enzyme activity has been characterized and showed not only polymerase but also lyase activity.

Topoisomerase II from *L. infantum*

In addition to the basic interest of the study of the DNA replication and repair in L. infantum those mechanisms and the enzymes involved in are well suited to be the specific target of anti parasitic drugs. In order to get a good antiparasitic drug, the

correspondiente está regulada a lo largo del ciclo celular del parásito y se correlaciona con la infectividad del mismo. Se ha conseguido la expresión de la proteína recombinante y su repliegamiento correcto a partir de los extractos solubilizados de los cuerpos de inclusión en *E.coli*. El enzima soluble es activo no solamente para la actividad polimerasa sino que también muestra actividad liasa. Se está realizando la caracterización del enzima así como midiendo su especificidad y fiabilidad frente a diferentes sustratos en el DNA.

Caracterización de la Topoisomerasa II de *L. infantum*

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

En este contexto, el estudio de la Topoisomerasa II responsable de la separación de las cadenas del DNA después de que se haya replicado resulta de gran interés ya que el mecanismo cumple todos los requisitos exigidos para el estudio de moléculas de acción antiparasitaria. Es un proceso específico cuya alteración o interrupción resulta letal para el parásito y no puede ser sustituido mediante la utilización de una vía alternativa. Se ha clonado el gen codificante de la Topoisomerasa II de *L. infantum* y se ha procedido a su caracterización y obtención en forma recombinante. Asimismo se está estudiando la expresión del gen durante el ciclo celular del parásito. Experimentos de medida de mRNA específico del gen han mostrado que en la fase intracelular del parásito se expresa en mayor cantidad que en la extracelular. En esta, los niveles del mRNA del gen TOP2 son similares pero la proteína se detecta solamente en la fase logarítmica y no en la estacionaria lo que indica que está regulada post-transcripcionalmente. Asimismo se han llevado a cabo experimentos de complementación del gen en cepas deficientes de *S. cerevisiae* y se ha visto que el gen es funcional en la levadura y su producto activo pues funciona sobre el DNA de la levadura eliminando los superenrollamientos positivos del mismo.

candidate molecule has to fulfil several criteria. First, the inhibitory activity has to be specific. Second, the inhibited activity has to be essential for the life of the parasite and should not have any metabolic alternate way. In this context, the study of the Topoisomerase II of L. infantum, responsible of the separation of the daughter DNA chains after replication fits all the requirements. This is an specific process, do not show any alternate way and the inhibition of the process is lethal for the parasite. L. infantum. Topoisomerase II has been cloned and is being obtained in a recombinant form to characterize it. The expression of the encoding gene has been tracked along the parasite life cycle. The amount of specific mRNA has been measured by RT-PCR semiquantitative and showed a 20% increase in the intracellular amastigote form over the extracellular promastigote. The two different phases proliferative and no proliferative promastigotes showed similar levels of the TOP2 mRNA. However, the protein was absent in the no proliferative form. This indicate a post-transcriptional regulation of the enzyme. Complementation studies with S. cerevisiae defective strains and relaxation experiments showed that the TOP2 gene is able to substitute the yeast topo II and that the gene product was active with the yeast DNA.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, BIO099-0853 (1999-2002)
- CICYT, BIO2000-0149-P4-04 (2002-2003)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Gonzalo, R.M., Rodríguez, J.R., Rodríguez, D., González-Aseguinolaza, G., Larraga, V., and Esteban, M. (2001) A prime/booster regimen based on immunisation with purified protein p36 of *Leishmania infantum* followed by *Vaccinia* virus recombinant expressing p36 and interleukin-12, triggered a protective Th1 response against cutaneous leishmaniasis. *Microb. Infect.* 3, 9, 701-711.
- Taladriz, S., Hanke, T., Ramiro, M.J., García-Díaz, M., García de Lacoba, M., Blanco, L., and Larraga, V. (2001) Nuclear DNA polymerase beta from *Leishmania infantum*. Cloning, molecular analysis and developmental regulation. *Nucl. Acids Res.* 29, 3822-3834.
- Gonzalo, R.M., Del Real, G., Rodríguez, J.R., Rodríguez, D., Heljasvaara, R., Lucas, P., Larraga, V., and Esteban, M. (2002) A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant *vaccinia* virus expressing the *Leishmania infantum* p36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 20, 1226-1231.
- Ramiro, M.J., Hanke, T., Taladriz, S., and Larraga, V. (2002) DNA polymerase beta mRNA determination by relative quantitative RT-PCR from *Leishmania infantum* intracellular amastigotes. *Parasitol. Res.* 88, 760-767.
- Taladriz, S., Ramiro, M.J., Hanke, T., and Larraga, V. (2002) S-Adenosylmethionine decarboxylase from *Leishmania infantum* promastigotes. Molecular cloning and differential expression. *Parasitol. Res.* 88, 421-426.

Próximos Artículos/ Forthcoming Articles

- Ramiro, M.J., Zárata, J.J., Hanke, T., Rodríguez, D., Rodríguez, J.J., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J.A., and Larraga, V. (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and *vaccinia* recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, (en prensa/in press).

PATENTES/PATENTS

- Larraga, V., González-Aseguinolaza, G., Lucientes, J., and Castillo, J.A. (2001) "Vacuna para la protección de animales frente a *Leishmania*". Pat.España nº P 200100402.
 - Larraga, V., González-Aseguinolaza, G., Ramiro, M.J., Castillo, J.A., and Lucientes, J. "Adición de la patente ES2001100402. Vacuna para la protección de perros frente a *Leishmania*". Patente España. Nº 200102057
 - Larraga, V., González-Aseguinolaza, G., Ramiro, M.J., Castillo, J.A., and Lucientes, J. "Vacuna para la protección de animales frente a *Leishmania*". Patente PCT/ES02/00077.
 - Gómez, P., Castillo, J.A., Lucientes, J., Gascón, M.F., and Larraga, V. "Nueva composición terapéutica inmunomoduladora". P200203023
-

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

GLORIA DEL SOLAR DONGIL

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

CONCEPCIÓN NIETO MAZARRÓN

Investigadora Contratada / Research Associate

PABLO AGUILAR (II-IX, 2001)

LARISA CYBUSKI (V-VIII, 2002)

PENKA PETROVA (VII-IX, 2002)

Investigadoras Visitantes / Visiting Scientists

MARIA EUGENIA FARIAS (Hasta V-2001)

B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

CARMEN DE ANTONIO PÉREZ (Desde IX-2001)

ANA MARIA HERNÁNDEZ ARRIAGA

JOSÉ ANGEL RUIZ MASÓ

B. Predoctorales / Graduate Students

M^a TERESA ALDA LÓPEZ

Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Replicación, Represor transcripcional, Plásmidos

Keywords: Replication, Transcriptional repressor, Plasmids

Replicación de la hebra líder de pMV158

Leading strand replication of pMV158

pMV158 replica mediante círculo rodante y tiene alto número de copias. La replicación se inicia por el ataque nucleofílico de la proteína iniciadora, RepB, sobre el enlace fosfodiéster del dinucleótido GpA. Se está estudiando la interacción de RepB con el origen de replicación, determinando los contactos de la proteína con su DNA diana y la estabilidad de los complejos RepB-DNA.

pMV158 is a high copy number streptococcal plasmid that replicates by the rolling circle mechanism. Replication of the leading strand is initiated by the plasmid-encoded RepB protein, which exerts a nucleophilic attack on the phosphodiester bond of the di-nucleotide GpA. We are studying the interactions RepB-origin of replication by determining: i) RepB-DNA contacts, and ii) stability of the RepB-DNA complexes.

Papel de la helicasa PcrA en la replicación de pMV158

El gen *pcrA* de *Streptococcus pneumoniae* codifica la proteína PcrA, una helicasa necesaria para la replicación de plásmidos como pMV158. PcrA de *S. pneumoniae* es homóloga a las helicasas PcrA de bacterias Gram-positivas (G+) y a las proteínas Rep y UvrD de *Escherichia coli*. Se ha clonado el gen *pcrA* de pneumococos en un sistema de expresión de *E. coli*. Se ha secuenciado el gen e identificado su región promotora en *S. pneumoniae* y *E. coli*.

Control de la replicación de pMV158

pMV158 codifica dos elementos que controlan su replicación: el represor CopG y el RNA contratranscrito ctRNA II. Ambos inhiben la expresión del gen esencial *repB*, actuando a dos niveles. El promotor del ctRNA II solapa con el codón de iniciación de *repB*, transcribiendo en sentido contrario al operón *copG-repB*, de modo que la región 5' del ctRNA es complementaria al sitio de unión de los ribosomas de *repB*. Se ha determinado que el ctRNA II finaliza en una región con características de terminador independiente de Rho. La eficiencia de terminación en esta región es muy elevada (90%), lo que concuerda con la eficiencia teórica predicha para este terminador. Usando DNAs moldes con deleciones de distinta longitud en el terminador comprobamos que la estabilidad de la estructura tallo-lazo del ctRNA influye en la eficiencia de terminación intrínseca. La proteína CopG es prototipo de una familia de represores transcripcionales codificados por plásmidos que replican mediante círculo rodante. CopG es un homodímero esférico de 45 residuos con un radio de Stokes de 16 Å. Un dímero de CopG [(CopG)₂] unido a su DNA diana (que incluye un elemento pseudosimétrico de 13 pb, IR) ocupa una vuelta de hélice. CopG tiene una organización tipo ribon-helix-helix (RHH), similar a los represores Arc, Mnt y MetJ y (CopG)₂ se une a cada lado del IR. CopG representa la mínima estructura de unión a DNA. Aunque las estructuras tridimensionales de (Arc)₂ y (CopG)₂ son superponibles, la superficie de interacción dímero-dímero de CopG unida a su DNA diana es casi el doble que la observada para (Arc)₂-DNA. La diana específica de CopG no sólo incluye el IR sino que se extiende unos 50pb, lo que implica la unión de varios dímeros de CopG. Todas las putativas proteínas Cop de plásmidos de la familia de pMV158 tienen un motivo RHH.

Role of PcrA helicase in pMV158 replication

Gene *pcrA* of *S. pneumoniae* encodes protein PcrA, a helicase involved in DNA repair and in replication of plasmids like pMV158. Pneumococcal PcrA helicase is homolog to PcrA proteins from others Gram-positive (G+) bacteria and shows significant homology with Rep and UvrD of *Escherichia coli*. Gene *pcrA* has been cloned in an expression *E. coli* system to overproduce the protein. The gene has been sequenced and the promoter region has been identified in pneumococcus and in *E. coli*.

Control of pMV158 replication

pMV158 encodes two elements involved in regulation of its replication, namely a repressor protein and a small counter-transcribed RNA, ctRNA. They act at different levels during the expression of the essential *repB* gene. The promoter of the ctRNA overlaps the *repB* start codon, and promotes transcription in opposite direction to that of the *copG-repB* operon, so that the 5'-end of the ctRNA is complementary to the *repB* ribosome binding site. Thus, binding of the ctRNA blocks *repB* translation initiation signals, through a direct inhibition mechanism. Synthesis of the ctRNA ends within a DNA region that exhibits the typical features of a Rho-independent terminator. Transcription termination at this region is very efficient (90%), which agrees with the theoretical efficiency predicted for this intrinsic terminator. Using a series of template DNAs harbouring deletions of different lengths in the terminator, it has been shown that the stability of the ctRNA hairpin has a major influence on the efficiency of intrinsic termination. CopG is the prototype of transcriptional repressors proteins encoded by plasmids of the pMV158 family. CopG is a 45-residues homodimer with a Stokes radius of 16 Å. A CopG dimer [(CopG)₂] bound to its target DNA (that contains a 13-bp pseudosymmetric element, IR) occupies one helical turn. CopG has a ribbon-helix-helix (RHH) structure similar to those of repressors Arc, Mnt and MetJ. One (CopG)₂ is bound to each half-site of the IR. The RHH structure of CopG shows that it has the minimal DNA binding structure. Although the three-dimensional structures of (Arc)₂ and (CopG)₂ can be superimposed, the dimer-dimer interaction surface of CopG bound to DNA is twice as much as that observed in (Arc)₂-DNA. In spite of the small size of CopG, its

Movilización de pMV158

pMV158 es movilizable a otras células mediante funciones aportadas por el propio plásmido (la proteína MobM) y por plásmidos auxiliares. MobM introduce un corte específico de sitio y hebra en el origen de transferencia, *oriT*, quedando unida covalentemente al extremo 5' del DNA sustrato. Hemos optimizado la purificación de MobM y determinado que es un dímero elipsoidal con alto contenido en alfa-hélices. Se ha estudiado la inhibición de la transferencia de pMV158 entre bacterias G+ por un compuesto específico, el cual puede ser considerado como un inhibidor de la conjugación bona fides.

Control de la expresión del regulón mal de *S. pneumoniae*

La proteína MalR pertenece a la familia de represores LacI/GalR y está implicada en el control de la expresión del regulón *mal* mediante unión a dos regiones operadoras, OM y OX. Estas regiones están cerca de la posición +10 del inicio de transcripción de los operones *malMP* y *malXCD*, siendo la represión de MalR más eficiente sobre el primer operón que sobre el segundo. MalR interfiere en la iniciación de la transcripción en *malMP* impidiendo el acceso de la RNA polimerasa al promotor PM. Una vez unida la RNA polimerasa, MalR es incapaz de desplazarla. La represión óptima de la expresión del operón *malMP* solo necesita la región OM. Utilizando las regiones PM/OM se han desarrollado vectores de expresión para pneumococos. Uno de ellos contiene el gen *mobM* de pMV158, lo que permite la movilización conjugativa del vector a otras bacterias G+.

specific target spans 50 bp, indicative of the binding of several CopG dimers. Sequence alignment of CopG with the other Cop proteins of the pMV158 family of plasmids shows that they all display a RHH motif and exhibit the same structure as CopG.

Mobilisation of pMV158

pMV158 can be mobilized by functions encoded by itself (protein MobM), and others provided by auxiliary plasmids. MobM cleaves its target DNA at the origin of transfer, oriT, and remains covalently bound to the 5-end of the DNA. We have optimised MobM production, and shown that the protein is a dimer with an ellipsoidal shape, and has a high content in alpha helices. We have studied the inhibition of pMV158 transfer between Gram-positive bacteria by a specific compound which can be considered as a bona fides conjugation inhibitor.

Expression control of the mal regulon in S. pneumoniae

Protein MalR regulates expression of the pneumococcal mal regulon by binding to two operator sequences, OM and OX, that are located at position +10 position of the transcription start point of the malMP and malXCD operons. MalR repression is more efficient on the former than on the latter operon. MalR interferes in initiation of the transcription on the malMP operon, inhibiting binding of the RNA polymerase to the PM promoter. Once RNA polymerase is bound to PM, MalR is unable to displace the polymerase from PM. Optimal repression of the malMP operon only needs OM. We have developed expression vectors for gram-positive bacteria by the use of the PM-OM region. One of these vectors has the mobM gene, and can be used for its mobilization to other gram-positive bacteria.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT-UE, 2FD97-0518 (1999-2001)
- MCyT, BMC2000-550 (2001-2003)
- UE, QLK2-CT-2000-01624 (2001-2003)
- Instituto de Salud Carlos III, FISS01/0956 (2001-2003)
- UE, QLK3-CT-2001-00277 (2002-2004)
- CAM, Programa de Grupos Estratégicos

Publicaciones / Publications

Artículos en Revistas / Journal Articles

- Costa, M., Solá, M., del Solar, G., Eritja, R., Hernández Arriaga, A.M., Espinosa, M., Gomis-Rüth, F.X., and Coll, M. (2001) Plasmid transcriptional repressor CopG oligomerises to render helical superstructures unbound and in complexes with oligonucleotides. *J. Mol. Biol.* 310, 403-417.
- Del Solar, G., and Espinosa, M. (2001) In vitro analysis of the terminator TII of the inhibitor antisense rna II gene from plasmid pMV158. *Plasmid* 45, 75-87.
- Nieto, C., Puyet, A., and Espinosa, M. (2001) MalR-mediated regulation of the *Streptococcus pneumoniae* malMP operon at promoter PM : influence of a proximal divergent promoter region and competition between MalR and RNA polymerase proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 14946-14954.
- Del Solar, G., Hernández-Arriaga, A.M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M., and Espinosa, M. (2002) A genetically economical family of plasmid-encoded transcriptional repressors involved in the control of plasmid copy number. *J. Bacteriol.* 184, 4943-4951 (Portada).

Artículos de divulgación / Divulgatory articles

- Fernández de Palencia, P., Nieto, C., Acebo, P., Espinosa, M. y López, P. (2001) *Streptococcus pneumoniae*: nuevas herramientas genéticas para estudiar un viejo patógeno. *Ibérica. Temas de Hoy*, 545-547.
 - Ruiz-Masó, J.A. y Espinosa, M. (2001) Las bacterias de la guerra. *TEMAS* 85, 26-28.
-

Energética y Dinámica de Interacciones Macromoleculares (en la División Celular Bacteriana)

Energetics and Dynamics of Macromolecular Interactions (in Bacterial Cell Division)

GERMÁN RIVAS CABALLERO
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ANDREW KRALICEK (Hasta VII-2001)
Becario Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

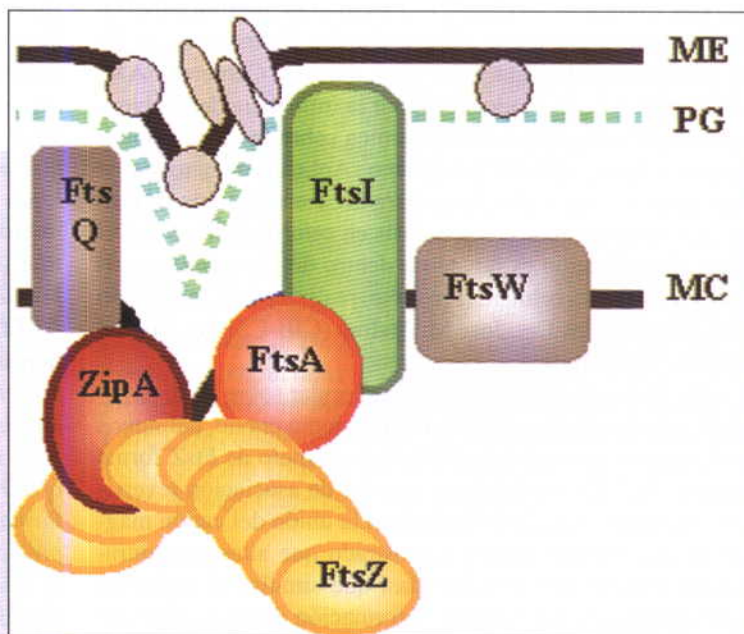
JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ IZQUIERDO
PILAR LÓPEZ NAVAJAS (Desde IX-2001)
B. Predoctorales / Graduate Students

MERCEDES JIMÉNEZ SARMIENTO
Personal Técnico / Technician



Figura 1: La maquinaria de división celular bacteriana. Esquema del complejo de septador de *E. coli*, adaptado de L. Rothfield et al. (1999) Annu. Rev. Genet. 33, 423-428. MC: Membrana citoplasmática. PG: Peptidoglicano. ME: Membrana externa. Cortesía del Dr. Miguel Vicente (CNB-CSIC, Madrid).

Figure 1: The bacterial cell division machinery. Scheme of the *E. coli* septator complex, adapted from L. Rothfield et al. (1999) Annu. Rev. Genet. 33, 423-428. MC: Cytoplasmic membrane. PG: Peptidoglycan. ME: External membrane. Courtesy of Dr. Miguel Vicente (CNB-CSIC, Madrid).



Palabras clave: Proteínas, citoesqueleto, FtsZ, Aglomeración macromolecular, Bioquímica estructural, Bioquímica física, Biofísica, Centrifugación analítica

Organización estructural e interacciones funcionales de la proteína de división celular bacteriana FtsZ

Nuestro grupo está interesado en conocer la influencia de factores del ambiente intracelular sobre la organización estructural e interacciones funcionales de la proteína FtsZ. FtsZ, ancestro bacteriano de la tubulina del citoesqueleto eucariota, es un componente mayoritario y esencial de la maquinaria de división celular en bacterias (el complejo del septador; Fig. 1), por lo que constituye una atractiva diana de nuevos agentes antibacterianos. A diferencia de las condiciones experimentales de disolución comúnmente empleadas en el laboratorio, el ambiente intracelular donde FtsZ se localiza y funciona posee una alta fracción de volumen ocupado por macromoléculas, siendo la concentración total aproximada de las mismas de alrededor de 400 g/l (Fig. 2). Este fenómeno de aglomeración macromolecular, que se da en la mayoría de los sistemas biológicos, puede modificar considerablemente la energética y la dinámica de reacciones y procesos bioquímicos funcionales, pero su papel en la división bacteriana no ha sido explorado. De manera coordinada, con la Dra. Marisela Vélez (Inst. Nicolás Cabrera, UAM, Madrid), hemos comenzado a estudiar la influencia del ambiente lipídico de la membrana citoplásmica sobre las asociaciones funcionales en el septador bacteriano. Aplicamos métodos de bioquímica estructural y biofísica para la caracterización de proteínas y sus interacciones, con énfasis en centrifugación analítica. Esta aproximación es novedosa dentro del abordaje experimental en división celular. [Proyecto realizado en asociación con los grupos de los Drs. José M. Andreu (CIB-CSIC) y Miguel Vicente (CNB-CSIC)]

Efecto de la aglomeración macromolecular sobre la oligomerización y el ensamblaje de FtsZ. En un estudio previo, habíamos descrito que, en presencia de GDP, el monómero de FtsZ forma oligómeros lineales mediante un proceso de asociación reversible, no cooperativo y que está ligado a la unión del catión magnesio. Recientemente, hemos demostrado que altas concentraciones de proteínas no relacionadas, que simulan el ambiente intracelular bacteriano, facilitan la formación de estos oligómeros de GDP-FtsZ, de acuerdo con las predicciones de la teoría de

Key words: Proteins, Cytoskeleton, FtsZ, Macromolecular crowding, Structural biochemistry, Physical biochemistry, Biophysics, Analytical centrifugation

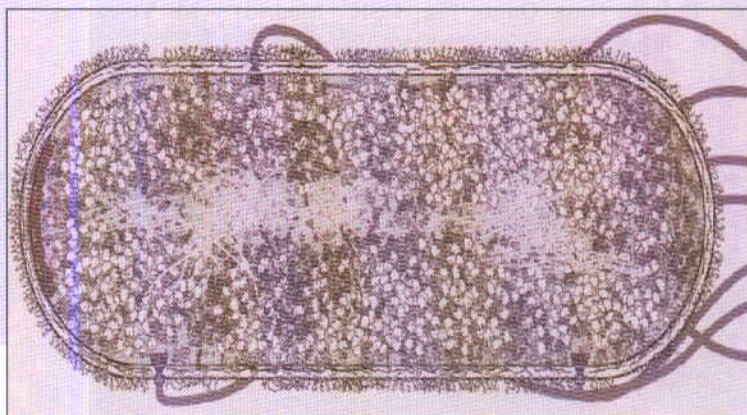
Structural organization and functional interactions of the FtsZ bacterial cell division protein.

Our group is interested in understanding the influence of factors of the intracellular environment upon the structural organization and functional interactions of the FtsZ protein. FtsZ, bacterial ancestor of tubulin, is a main - and essential - component of the bacterial cell division machinery (the septator complex, Fig. 1), which makes it an attractive target of new anti-bacterial agents. In contrast to the experimental solution conditions commonly used in the laboratory, the intracellular environment in which FtsZ is located and function in vivo is highly volume-occupied ("crowded"), with a total concentration of proteins and nucleic acids on the order of 400 g/L (Fig. 2). Although excluded volume is likely to have a substantial effect on the energetics and dynamics of functional biochemical processes in such medium, the influence of crowding on the association and assembly reactions involved in bacterial cell division has been largely unexplored. In a coordinated way, with Dr. Marisela Vélez (Inst. Nicolás Cabrera, UAM, Madrid), we have also begun to study the influence of the lipid environment at the cytoplasmic membrane on the structure and associations of septator components. We apply methods of structural biochemistry and biophysics to characterize protein interactions, with emphasis in analytical centrifugation. This is a novel experimental approach in the bacterial cell division field. [Project in association with the groups of Drs. José M. Andreu (CIB-CSIC) and Miguel Vicente (CNB-CSIC, Madrid)].

Effect of macromolecular crowding upon FtsZ oligomerization and assembly. In a previous study, we had shown that, in the presence of GDP, the FtsZ monomer forms linear oligomers by means of a reversible, non-cooperative, magnesium-linked process. Recently, we have demonstrated that high concentrations of unrelated proteins, resembling the bacterial inside, favour the formation of these GDP-FtsZ oligomers, in agreement with the predictions of excluded volume theory. Finally, we have begun to study crowding effects upon the more complex assembly processes taking place in the presence of GTP. The results obtained show that crowding has a considerable effect upon the structu-

Figura 2: Los sistemas biológicos están aglomerados. Representación de la célula de *E. coli*, adaptada de "The Machinery of Life" (D. Goodsell, 1992). Cortesía del Dr. Dennis Bray, Univ. Cambridge, Reino Unido.

Figure 2: Living systems are crowded. Cartoon of E. coli cell, adapted from "The Machinery of Life" (D. Goodsell, 1992). Courtesy of Dr. Dennis Bray, Univ. Cambridge, UK.



volumen excluido en medios altamente aglomerados. Por último, hemos comenzado a estudiar el efecto de la aglomeración macromolecular sobre los más complejos procesos de ensamblaje de FtsZ que tienen lugar en presencia de GTP. Los resultados obtenidos indican que este factor fisiológico intracelular posee un considerable efecto sobre la organización estructural y las propiedades dinámicas de los polímeros de FtsZ. Esta información es importante para comprender el comportamiento de *FtsZ in vitro*, es de interés práctico para la optimización de ensayos de búsqueda de nuevos agentes antibacterianos, y es de potencial relevancia para entender eventos de la división celular en bacterias.

Métodos de bioquímica estructural y biofísica

Para la realización de los estudios más arriba mencionados desarrollamos y aplicamos métodos de centrifugación analítica y de espectroscopía de fluorescencia (interacciones en disolución), y métodos de microscopía de fuerzas atómicas combinada con tecnología de biosensores ópticos (interacciones en sistemas de membrana) que son únicos para la caracterización de la organización estructural y las asociaciones funcionales de proteínas en condiciones más próximas a las fisiológicas. Estas metodologías están siendo también aplicadas en la caracterización de interacciones proteína-proteína y proteína-DNA en sistemas de replicación procariotas (con el laboratorio del Dr. R. Giraldo, CIB-CSIC), y de interacciones funcionales de proteínas del plasma sanguíneo implicadas en procesos de proliferación celular (con el laboratorio del Dr. G. Giménez-Gallego, CIB-CSIC).

ral organization and dynamic properties of FtsZ polymers. This information is important to understand the behavior of FtsZ in vitro, is of practical interest to optimize screening assays to identify new antibacterial agents, and is of potential relevance for understanding bacterial cell division events.

Methods of structural biochemistry and biophysics.

To fulfill the above mentioned studies we develop and apply methods of analytical centrifugation and fluorescence spectroscopy (solution interactions), and methods of atomic force microscopy combined with optical biosensor technology (surface/membrane interactions), which are unique to characterize the structural organization and associations of proteins in conditions resembling more closely the physiological media. These methods are also being applied in the characterization of protein-protein / protein-DNA interactions in bacterial replication (with the group of Dr. R. Giraldo, CIB-CSIC) and in the study of functional interactions of blood plasma proteins involved in cell proliferation (with the group of Dr. G. Giménez-Gallego, CIB-CSIC). [In collaboration with Drs. A. P. Minton (NIH, Bethesda, USA), P. Lillo (Inst. Quím. Fís. CSIC, Madrid), and M. Vélez (Inst. Nicolás Cabrera, UAM, Madrid)].

[En colaboración con los Drs. A.P. Minton (NIH, Bethesda, USA), P. Lillo (Inst. Quím. Fís., CSIC, Madrid) y M. Vélez (Inst. Nicolas Cabrera, UAM, Madrid)].

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MCYT, BIO99-0859-C03-03 (1999-2002)
- CAM, Programa Grupos Estratégicos (2000–2003)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Díaz, J.F., Kralicek, A., Mingorance, J., Palacios, J.M., Vicente, M., and Andreu, J.M. (2001) Activation of cell division protein FtsZ. Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide gamma-phosphate. *J. Biol. Chem.* 276, 17307-17315.
- Rivas, G., Fernández, J.A., and Minton, A.P. (2001) Direct observation of the enhancement of non-cooperative protein self-assembly by macromolecular crowding: Indefinite self-association of bacterial cell division protein FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3150-3155.
- Garnier, C., Barbier, P., Briand, C., Rivas, G., and Peyrot, V. (2002) Hydrodynamic properties and quaternary structure of the 90-kDa heat-shock protein (hsp90): Effects of divalent cations. *Biochemistry* 41, 11770-11778.
- Gasset, M., Alfonso, C., Neira, J.L., Rivas, G., and Pajares, M.A. (2002) Equilibrium unfolding studies of rat liver methionine adenosyltransferase III, a dimeric enzyme with intersubunit active sites. *Biochem. J.* 361, 307-315.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

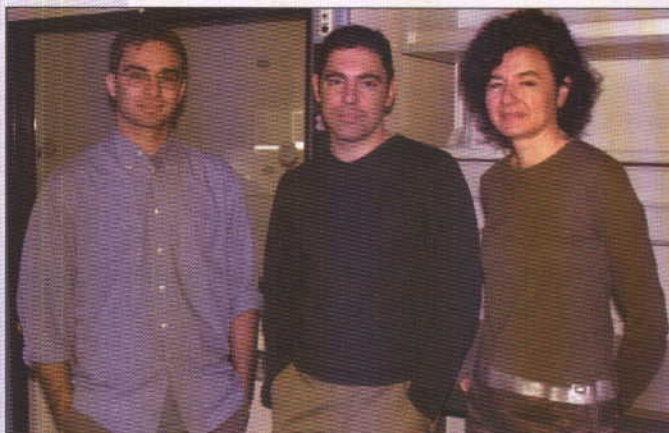
- Benavides, C.C.P., Mateo, C., Carrascosa, A.V., Vian, A., García, J.L., Rivas, G., Alfonso, C., Guisán, J.M., and Fernández-Lafuente, R. (2003) One step purification, covalent immobilization and additional stabilization of a thermophilic poly-His-tagged-galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy Sephabeads. *Biomacromolecules* (en prensa / in press).
 - González, J.M., Rivas, G., and Minton, A.P. (2003) The effect of large refractive index gradients upon the performance of absorption optics in the Beckman XL-A/I analytical ultracentrifuge: An experimental study. *Anal. Biochem.* (en prensa / in press).
 - Zorrilla, S., Jiménez, M., Lillo, P., Rivas, G., and Minton, A.P. (2003) General analysis of sedimentation equilibrium in highly non-ideal solutions of associating solutes: Application to ribonuclease. *Biophys. Chem.* (en prensa / in press).
-

Microscopía Electrónica y Reconstrucción Tridimensional de Macromoléculas *Electron Microscopy and Three Dimensional Reconstruction of Macromolecules*

ÓSCAR A. LLORCA BLANCO
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ANGEL RIVERA-CALZADA
B. Predoctora I / Graduate Student

JASMINKA BOSKOVIC
Personal Técnico / Technician



Palabras clave: Microscopía Electrónica, Reconstrucción 3D, ATM, DNA-PK

Nuestro grupo es de muy reciente creación dentro del CIB y su objetivo es la puesta a punto de una línea de reconstrucción tridimensional de complejos macromoleculares mediante técnicas de crío-microscopía electrónica y procesamiento digital de imágenes. Estas metodologías permiten obtener estructuras 3D a resoluciones en torno a los 10-30Å utilizando pequeñas cantidades de proteína. Los volúmenes obtenidos se pueden combinar con las estructuras atómicas existentes de sus componentes o dominios para obtener modelos "pseudo-atómicos". La microscopía electrónica de macromoléculas permite trabajar con complejos en condiciones nativas y funcionales. Además se trata de una herramienta muy útil para analizar cambios conformacionales en las llamadas "maquinas moleculares" donde múltiples proteínas interaccionan de manera coordinada para desarrollar una actividad.

El objetivo final del grupo es combinar la información 3D obtenida mediante crío-microscopía electrónica con información a resolución atómica, datos genéticos, bioquímicos y de biología celular para desarrollar modelos moleculares de distintos procesos celulares. En la actualidad estamos trabajando fundamentalmente sobre dos sistemas:

Keywords: *Electron Microscopy, 3D Reconstruction, ATM, DNA-PK*

Our group has been established at the CIB only very recently. Our aim is to carry out three dimensional reconstructions of macromolecular complexes using cryo-electron microscopy and digital image processing. These techniques provide 3D structures at a resolution of ~10-30Å using small amounts of purified protein. The resulting volumes can then be combined with atomic resolution structures of their different components and domains into a "pseudo-atomic" model. The electron microscopy of macromolecules allows visualisation of protein complexes under native and functional conditions. Also, it is a very useful tool to analyse conformational changes in "molecular machines" where multiple proteins interact to perform there tasks.

The final goal of our team is to combine the 3D information obtained from cryo-electron microscopy with structures at atomic resolution, genetic, biochemical and cell biology data to propose molecular models of several cellular processes. We are currently working with two systems:

- DNA repair kinases (ATM and DNA-PK). These are proteins with a molecular weight of 360 and 470 kDa respectively involved in double-stranded DNA damage sensing and repair.

- Quinasas de reparación de ADN (ATM y DNA-PK). Se trata de proteínas de 360 y 470 kDa respectivamente que participan en los procesos de detección y reparación de roturas en la doble hebra de ADN. Mutaciones en estas proteínas están relacionadas con una mayor incidencia de determinados tipos de tumores.

- Endo180, es una proteína de 180 kDa perteneciente a la familia del receptor de manosa implicada en remodelación de la matriz extracelular mediante su interacción con colágeno, azúcares y uPAR (“urokinase plasminogen activator receptor”). Endo180 se sobre-expresa en el endotelio de tejidos tumorales y se le relaciona con la capacidad de invasión de los mismos.

Disponemos en la actualidad de información sobre la estructura 3D de estas tres proteínas procesadas digitalmente en el CIB y estamos trabajando en el análisis de sus complejos con otras proteínas y DNA que forman durante su ciclo funcional.

Mutations in either protein have been associated to several tumours and disorders.

- Endo180 is a 180 kDa protein, member of the mannose receptor family and implicated to play a role in extracellular matrix remodelling through its interaction with collagens, sugars and uPAR (urokinase plasminogen activator receptor). Endo180 is highly up-regulated in tumour endothelium and could be related with their invasiveness.

We already have information about the 3D structure of these three proteins obtained using the image processing facilities set up in our group at the CIB. We are now analysing the protein-protein and protein-DNA complexes they can establish as part of their functional cycle.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

— MCYT, SAF2002-01715 (2003-2006)

Departamento de Inmunología

Department of Immunology

Jefe de Departamento
Department Head

ÁNGELES GARCÍA PARDO

Profesores de Investigación

SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA

Investigadores Científicos

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

Científicos Titulares

ISABEL BARASOAIN BLASCO
LUISA M^a BOTELLA CUBELLS
ALICIA GARCÍA ARROYO
EDUARDO PÁEZ ABRIL
AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ
JOAQUÍN TEIXIDÓ CALVO
MIGUEL ANGEL VEGA PALACIOS

Personal Técnico

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

Secretaria

CARMEN PARTEARROYO LACABA

Activación de Linfocitos T *T-lymphocyte Activation*

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

M^a JOSÉ FEITO CASTELLANO (Hasta X-2001)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

RAQUEL BELLO COLLANTES
ALEJANDRA SÁNCHEZ PÉREZ
B. Predoctorales / Graduate Students

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



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

Keywords: T lymphocytes, TCR/CD3, ICOS, CD46

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

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

El complejo del receptor para antígeno de los linfocitos T (Complejo TCR/CD3) define a esta subpoblación de linfocitos, siendo el encargado del reconocimiento específico de antígenos y de la transducción de señales activadoras al interior celular. Es, por tanto, un componente esencial en el desarrollo de respuestas inmunitarias adaptativas frente a organismos patógenos, contribuyendo a la diferenciación de los linfocitos T y al desarrollo de enfermedades autoinmunes y otras inmunopatologías. Mientras que el reconocimiento antigénico se lleva a cabo por el TCR, una estructura dotada de una gran variabilidad, la transmisión de señales se lleva a cabo por las cadenas invariantes CD3. A pesar de lo anterior, nuestro grupo pudo detectar variabilidad en las cadenas de CD3 de dos maneras diferentes: primero, por las variaciones en la avidéz de un anticuerpo anti-CD3 (YCD3-1) frente al CD3 de distintas líneas T; y en segundo lugar por las diferencias en el reconocimiento de CD3 epsilon de distintas líneas por anticuerpos específicos para la secuencia amino-terminal de CD3 epsilon de ratón. Estas diferencias se correlacionan con diferencias en la fuerza de la interacción TCR-CD3, y no son debidas al "splicing" alternativo del RNAm de CD3 epsi-

The expression of the T-cell antigen receptor complex (TCR/CD3 complex) defines this lymphocyte subpopulation, and is the structure responsible for the specific recognition of foreign antigens and the transduction of activation signals to the cell. Consequently, it is an essential element in the development of adaptative immune responses against pathogenic organisms, in the development of autoimmune diseases and allergies, and in T lymphocyte differentiation. Whereas the TCR module, a highly variable structure, is responsible for specific antigen recognition, signal transduction is carried out by means of the invariant CD3 gamma, delta, epsilon, and zeta chains. Previous work from our group was able to detect variability of CD3 chains as shown by: 1) differences in the binding avidity of one anti-CD3 antibody (YCD3-1) when tested with different mouse T cells or T cell lines; and 2) by differences in the recognition of CD3 epsilon chains from the surface of different T cells detected using an antibody specific for the amino-terminal sequence of mouse CD3 epsilon chains. These differences are not due to alternative splicing of CD3 epsilon mRNA in the region coding for the amino-terminal sequence of this chain, but to degradation by

lon en la secuencia codificante de la región amino-terminal de CD3 epsilon, sino a la degradación por metaloproteasas sensibles a fenantroline (Criado, G. y cols., *Eur. J. Immunol.* (2000) 30:1469). Hemos observado que estas diferencias se correlacionan con diferencias en la facilidad de ligandos del TCR para iniciar señales activadoras, con el estado de activación de los linfocitos T, y con el fenotipo Th1/Th2 o CD4+/CD8+ de las células T analizadas (datos no publicados).

Hemos sugerido un modelo de complejo TCR/CD3 en el que la interacción CD3-TCR es regulada por el número de cargas negativas en el extremo amino-terminal de CD3 epsilon, y en el que, como consecuencia, se producen variaciones en la accesibilidad de anticuerpos como YCD3-1 a su epítipo y en la activación celular. Para confirmarlo, estamos determinando mediante técnicas de proteómica las secuencias amino terminales de CD3 epsilon de distintos orígenes celulares, tratando de determinar las metaloproteasas implicadas en la variabilidad de CD3 epsilon. Además, mediante mutagénesis dirigida tratamos de analizar la influencia de las variaciones de la secuencia de CD3 epsilon en distintos aspectos de la estructura del complejo TCR/CD3 y en sus señales activadoras.

Coestimulación por ICOS, una molécula de la familia de CD28

En 1996 describimos, en colaboración con el grupo del Dr. Umberto Dianzani (U. Amedeo Avogadro, Novara, Italia), una nueva molécula coestimuladora detectada en linfocitos T de ratón y humanos mediante un anticuerpo monoclonal que fue denominada H4, y posteriormente ICOS ("Inducible Costimulator"). ICOS pertenece a la familia de CD28 y CTLA-4, dos moléculas fundamentales en el control de las respuestas de linfocitos T. Sin embargo ICOS tiene su ligando y patrón de expresión propios, por lo que sus características están siendo objeto de investigación muy intensa en los últimos años (Revisado en Rojo, J.M. y cols., ver publicaciones)

Una cuestión relevante es si la coestimulación mediada por ICOS es semejante a la de CD28, en cuyo caso su especificidad sería debida principalmente a los patrones de expresión de ICOS y su ligando, o si, además o independientemente, tiene mecanismos y dianas biológicas específicas. ICOS tiene homología estructural con CD28, y la conservación de un motivo de secuencia Y-M-x-M en el dominio citoplásmico, así como la

phenantroline-sensitive metalloproteases. Furthermore, they correlate with differences in the strength of the interactions between the TCR and CD3 modules (Criado, G. et al., Eur. J. Immunol. (2000) 30: 1469), as well as with differences in the ability of TCR ligands to induce activation signals; with the activation or resting state of the lymphocytes; or with the phenotype (Th1/Th2, or CD4/CD8) of the cells analysed (unpublished results).

Taking into account the characteristics of the amino-terminal region of CD3 epsilon chains, we have proposed a model of the TCR/CD3 complex where the interactions between the TCR and CD3 modules is regulated by the number of negatively-charged amino acid residues present in the amino-terminal region of CD3 epsilon, such that changes in the number of these residues alter the accessibility of the epitopes recognized by monoclonal anti-CD3 antibodies like YCD3-1, and also their ability to activate the cells. This model is being tested by determination, with proteomic techniques, of the amino-terminal sequences of CD3 from different cell sources. Other problem addressed is the precise nature of the metalloproteases involved in CD3 epsilon degradation. Furthermore, by means of directed mutagenesis we are analysing the consequences of changes in the sequence of CD3 epsilon in terms of the overall structure of the TCR/CD3 complex and the activation signals delivered.

ICOS, a member of the CD28 family, as a costimulatory molecule

In cooperation with Dr. Umberto Dianzani's group (U. Amedeo Avogadro, Novara, Italia), we described in 1996 a new costimulatory molecule detected in mouse and human T lymphocytes by means of a monoclonal antibody. This molecule was termed H4, and then ICOS (for "Inducible Costimulator"). ICOS belongs to the same family as CD28 and CTLA-4, two molecules essential to the control of T lymphocyte-mediated responses. However, ICOS has its own ligand, and a distinct expression pattern, being its characteristics the subject of intense research in recent years (see for a review Rojo, J.M. et al., under Publications).

A relevant question is whether ICOS-mediated costimulation mechanisms are similar to those mediated by CD28, or it has its own activation mechanisms and biological targets. If it has similar mechanisms as CD28, the specificity of ICOS costimulation

unión de PI-3 quinasa a ese motivo indican que ICOS y CD28 pueden usar algunas vías de señales comunes. Hemos analizado este problema en células de fenotipo Th2, que expresan ICOS constitutivamente (Feito, M.J. et al, Eur. J. Immunol. (2003) 33:204). En estas células, ICOS tiene claras semejanzas con CD28 en cuanto a que 1) la estimulación aumenta la asociación de PI-3 quinasa a ICOS; 2) ICOS aumenta señales tempranas de activación por el TCR/CD3, incluyendo la fosforilación de CD3 y Vav, o la activación de la tirosin-quinasa ZAP-70. 3) Los ligandos de ICOS sinergizan con las señales del TCR/CD3 para activar las MAP quinasas ERK, p38 y JNK y la secreción de IL-4 e IL-10. La activación de JNK, pero no de ERK o p38, es dependiente parcialmente de la expresión de CD4 por las células, mientras que la coestimulación por ICOS es parcialmente deficiente en células de ratones deficientes en CD28. La citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de actina, inhibe la coestimulación por ICOS de la activación de ZAP-70 o las MAP quinasas, y de la secreción de interleuquinas 4 y 10. La ciclosporina A y los inhibidores de proteína quinasa C no inhiben la activación de ZAP-70 o MAP quinasas, y la ciclosporina inhibe la secreción de IL-4, pero no de IL-10. Inhibidores de ERK y JNK inhiben parcialmente la producción de IL-4 e IL-10, mientras que los inhibidores de PKC o de p38 no tuvieron efectos significativos. Nuestros datos indican que, aunque no se pueden excluir diferencias en los mecanismos coestimuladores de CD28 e ICOS, ambos comparten algunas vías de activación durante los momentos tempranos de la activación de linfocitos T.

MCP (CD46): Propiedades coestimuladoras y función como receptor de patógenos en una molécula reguladora de complemento

En nuestro laboratorio estamos analizando dos aspectos funcionales de CD46 (Membrane cofactor protein, MCP): su papel coestimulador en la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4+ humanos, y sus mecanismos de unión a *Streptococcus pyogenes*. CD46 (MCP) es una glicoproteína de membrana de tipo I pertenecientes a la familia de Reguladores de Activación del Complemento (RCA) que protegen a las células de la lisis por complemento (C') autólogo. Previamente habíamos observado, en colaboración con el grupo de la Dra. Pilar Portolés (CN Microbiología, Instituto de Salud Carlos III), que Crry/p56, una molécula murina homóloga de CD46, tenía, además de su fun-

might be mainly governed by the expression patterns of ICOS and its ligand. ICOS is structurally homologous to CD28, having a conserved Y-M-x-M sequence motif in its cytoplasmic domain. Binding of PI-3 kinase to this motif might indicate that ICOS and CD28 share some activation signals. We have addressed this problem in T cells of the Th2 phenotype, constitutively expressing ICOS (Feito, M.J. et al., Eur. J. Immunol. (2003) 33:204). ICOS costimulation shows clear similarities with CD28 in these cells as 1) ICOS ligation enhances the association of PI-3 kinase to this molecule; 2) ICOS enhances early TCR-mediated activation signals, including the tyrosine phosphorylation of CD3 and Vav, or the activation of the ZAP-70 tyrosine kinase. 3) ICOS ligands synergize with TCR/CD3 signals for the activation of the MAP kinases ERK, p38, or JNK, as well as for the secretion of IL-4 and IL-10. ICOS costimulation of JNK activation, but not ERK or p38 activation, is partially dependent on CD4 expression by the cells, whereas ICOS costimulation is partially deficient in cells from CD28-deficient mice. Cytochalasin D, an actin polymerization inhibitor, blocks ICOS costimulation of ZAP-70 or MAP kinase activation, as well as IL-4 or IL-10 secretion. Cyclosporin A or PKC inhibitors do not inhibit ZAP-70 or MAP kinase activation, and Cyclosporin A blocks IL-4 secretion leaving IL-10 secretion unaffected. Inhibitors of ERK or JNK partially inhibit IL-4 or IL-10 production, yet p38 or PKC inhibitors did not significantly affect lymphokine secretion in this system. Taken together, our data show that, although we cannot exclude differences between CD28 and ICOS in terms of the costimulatory mechanisms used, both molecules share some activation pathways during the early moments of T cell activation.

MCP (CD46): Costimulatory properties and pathogen receptor function of a complement regulatory protein

*Our group is currently analysing two functional aspects of CD46 (Membrane Cofactor Protein, MCP), namely its costimulatory function in CD4+ T lymphocyte activation; and the mechanisms of binding to *Streptococcus pyogenes*. CD46 is a type I membrane glycoprotein belonging to the family of Regulators of Complement Activation (RCA) whose primary function is protecting the cells from the lysis by autologous complement (C'). In cooperation with Dr. Pilar Portolés (CN Microbiología, Instituto de Salud Carlos III), we had previously*

ción reguladora del complemento, una capacidad coestimuladora muy potente sobre la activación por ligandos del TCR/CD3 (Fernández-Centeno et al., *J. Immunol.* (2000) 164:4533). Puesto que CD46 es funcionalmente homólogo de Crry, y es además el receptor de distintos patógenos que incluyen virus como los del sarampión y el herpes virus 6, o bacterias como *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter*, o *Neisseria*, creímos conveniente analizar su potencial para modificar las respuestas de los linfocitos T (Sánchez et al., enviado).

En linfocitos T CD4+ de sangre periférica y en blastos de células CD4+ hemos observado que la co-ligación de CD3 y CD46 incrementa la proliferación celular y la secreción de IL-2 e IFN- γ , mientras que la secreción de IL-5 no se ve afectada o es inhibida ligeramente. Esto sugiere una capacidad de CD46 para inducir una diferenciación preferencial de los linfocitos T hacia un fenotipo Th1. La coestimulación por CD46 produjo incrementos de algunas señales tempranas de activación como la fosforilación en tirosinas de CD3 ζ y ZAP-70, o la activación de las MAP quinasas ERK, JNK, y p38. En cambio, no hemos detectado ningún cambio en los niveles de calcio intracelular, un fenómeno que se ha observado con otros ligandos de CD46 como los "pili" de *Neisseria*. Mediante inhibidores específicos de MAP quinasas hemos observado que el incremento en la activación de ERK es parcialmente responsable del incremento de la secreción de IL-2 e IFN- γ , así como de la inhibición de la secreción de IL-5. En cambio, en este sistema el aumento en la activación de p38 inhibe la secreción de IL-2 pero no aumenta, como en otros sistemas, la secreción de IFN- γ , que debe producirse por otros mecanismos.

El cruzamiento de CD46 por sí solo produce algunas señales tempranas en los linfocitos T, incluyendo un bajo nivel de fosforilación en tirosinas de CD3 ζ y ZAP-70. Estas bajas señales podrían alterar la capacidad de los linfocitos T para ser activados posteriormente (induciendo anergia o tolerancia). Sin embargo, en nuestro caso hemos visto que no modifican la capacidad de activación de los linfocitos T, o que, en todo caso, incrementan la respuesta a estímulos de CD3 en presencia de ligandos de CD28. La coestimulación por CD46 pone de manifiesto la plurifuncionalidad de esta molécula, que al potenciar selectivamente la activación de los linfocitos T puede contrarrestar el efecto inmunosupresor de ciertos patógenos, e incluso es posible que la unión de patógenos a CD46 en linfocitos T produzca directamente la activación selectiva de ciertas vías celulares,

observed that Crry/p65, a mouse molecule functionally homologous to CD46, had a strong costimulatory effect on TCR/CD3-mediated activation (Fernández-Centeno et al., J. Immunol. (2000) 164:4533). In view of the homology of CD46 and Crry, and the importance of CD46 as a cell receptor for different pathogenic microorganisms, including measles and herpes virus 6, or bacteria like Streptococcus pyogenes, Helicobacter, or Neisseria, we set up experiments to analyze its role as a costimulatory molecule for human T cell activation (Sánchez et al., submitted).

Coligation of CD3 and CD46 induced enhanced proliferation and secretion of IL-2 and IFN- γ of CD4+ from human peripheral blood or CD4+ blasts, whereas IL-5 secretion was unaffected or slightly inhibited, suggesting a Th1 bias in CD46-induced costimulation. CD46 costimulation enhanced some early TCR/CD3 signals, including tyrosine phosphorylation of CD3 ζ and ZAP-70, as well as the activation of the ERK, JNK, and p38 MAP kinases. No significant change was observed in intracellular Calcium, a phenomenon which has been previously described using Neisseria pili as a CD46 ligand. The effect of specific inhibitors indicated that enhanced ERK activation is partially responsible for augmented IL-2 and IFN- γ secretion as well as for lower IL-5 secretion observed upon CD46 costimulus. Inhibition of p38 suggested a negative role of p38 activation on IL-2 secretion by CD4+ blasts, and failed to show a positive role of this kinase in IFN- γ secretion by these cells, as has been described in other experimental systems.

Cross-linking of CD46 alone induced some early signals, including low-level tyrosine phosphorylation of CD3 ζ and ZAP-70. These low-level signals might alter the ability of T cells to be activated by a second stimulus (i.e. by inducing an anergic or tolerant state), yet these signals do not significantly modify the ability of CD4+ T lymphocytes to be activated. Rather, we have observed that, upon CD46 ligation, T lymphocytes have enhanced responses to CD3 stimuli in the presence of CD28 ligands. CD46 costimulation shows the multiple functional capabilities of this molecule, which might contribute to counteract immunosuppression by certain pathogens, or might, by itself, induce the selective activation of certain pathways in T lymphocytes, being a new example of the interactions between the innate and adaptive immunity

siendo un nuevo ejemplo de las interacciones entre los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa.

CD46 (MCP) como receptor celular de *Streptococcus pyogenes*

Estudios previos de otros grupos han mostrado que CD46 puede servir como receptor celular de *Streptococcus pyogenes* que expresan proteínas M del serotipo 6, aunque datos posteriores en otros sistemas experimentales y con otros serotipos han puesto en duda su papel como receptor de estreptococos. *S. pyogenes* causa infecciones supurativas cutáneas y del tracto respiratorio, e infecciones invasivas severas como la fasciitis necrosante. Estas infecciones pueden importantes tener secuelas autoinmunes, como glomerulonefritis o fiebres reumáticas. Las proteínas M son proteínas fibrilares expresadas en la superficie de *Streptococcus*, constituyendo un importante factor de virulencia. Las proteínas M tienen una región amino-terminal muy variable, lo que se traduce en la existencia de más de 80 serotipos conocidos. Además, las proteínas M unen distintas moléculas séricas pertenecientes a la familia RCA, tales como Factor H, FHL-1 y C4BP, y se ha descrito que tienen capacidad superantigénica.

En colaboración con el grupo del Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba (CIB, CSIC), estamos analizando la capacidad de aislados de *S. pyogenes* de distintos serotipos M para unir CD46. Empleando una proteína de fusión correspondiente a la región extracitoplásmica de CD46, y anticuerpos específicos frente a esta proteína de fusión, hemos comprobado que CD46 se une a *S. pyogenes*. CD46 se une con alta afinidad con estreptococos de serotipo M3, M4 y M18, así como algunas cepas M1, y con baja afinidad a cepas M6. Por otra parte, CD46 no se une a bacterias M11, M12, M27, M30, y otros aislados de serotipo M1. Esta variabilidad, y la inhibición de la unión de CD46 a bacterias M18 por C4BP, una molécula reguladora de complemento que se une a la región variable de proteínas M, sugiere que CD46 puede unirse a esta región, y no a las repeticiones C como ocurre en el serotipo M6. La región de proteínas M18 implicada en la interacción con CD46 está siendo analizada por distintos medios, incluyendo estudios de unión de CD46 a proteínas M recombinantes pertenecientes a distintos serotipos o defectivas en diferentes dominios moleculares.

CD46 (MCP) as a cellular receptor for *Streptococcus pyogenes*

Previous studies have established that CD46 serves as a cellular receptor of keratinocytes for S. pyogenes expressing M proteins of the M6 serotype, although data obtained in other experimental systems and using bacteria of other serotypes have cast some doubts on the role of CD46 as a receptor for group A streptococci. S. pyogenes causes suppurative cutaneous infections, as well as infections in the respiratory tract or severe invasive infections like necrotizing fasciitis. Some of these infections produce important autoimmune sequelae like glomerulonephritis or rheumatic fever. M proteins are fibrillary proteins expressed in the surface of streptococcus, where they are a prime virulence factor. These proteins have a highly variable amino-terminal region, producing more than 80 different known serotypes. M proteins are also known to bind different serum proteins of the RCA family, like Factor H, FHL-1, or C4BP, and some reports suggest their superantigenic properties.

In collaboration with Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba and his group (CIB, CSIC) we have analysed the ability to bind CD46 of different S. pyogenes isolates having distinct M serotypes. Using a recombinant protein comprising the extracytoplasmic domains of CD46 and one antibody specific for the same fusion protein, we have clearly established that CD46 binds to different strains of S. pyogenes. CD46 binds with high affinity to M3, M4, and M18 streptococci, as well as to some M1 isolates, and to M6 with low affinity. On the other hand, the binding of CD46 to isolates of the M11, M12, M27, M30, and certain M1 isolates was absent or negligible. This variability, plus the inhibition of CD46 binding to bacteria of the M18 serotype by C4BP (a complement regulatory protein which binds to the amino-terminal region of M proteins) suggest that CD46 binds to the same region, rather than to C repeats as previously described for M6 serotype. The region of M18 involved in the interaction with CD46 is currently under study by different approaches, including the analysis of C46 binding to recombinant M proteins from different serotypes, or lacking distinct molecular domains.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- Instituto de Salud Carlos III, 01/30 (2001-2003)
- DGI/PGC, BMC2001-2177 (2001-2004)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Rojo, J.M., Portolés, P., Yagi, J., and Dianzani, U. (2001) H4/ICOS: A costimulatory protein in the right place at the right time? *Inmunología* 20, 196-206.
- Feito, M.J., Jiménez, A., Ojeda, G., Sánchez, A., Portolés, P., and Rojo, J.M. (2002) The TCR/CD3 complex: Molecular interactions in a changing structure. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 50, 263-272.

Artículos de Divulgación/Press Articles

- Rojo, J.M. (2001) Avances en Inmunología: Complejos TCR/CD3. *Investigación y Ciencia* N° 303, Ciencia y Sociedad.
-

Adhesión Celular en el Sistema Inmune *Cell Adhesion in the Immune System*

ÁNGELES GARCÍA PARDO
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigadora de Carrera / Staff Scientist

BENITO CASANOVA HERNÁNDEZ (Hasta II-2001)
JOSÉ VICENTE MOYANO IDOETA
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

ESPERANZA CANTERO ALFARO
MERCEDES GARCÍA GILA (Hasta II-2002)
EVA MA. LÓPEZ MARTIN
ALFREDO MAQUEDA FERNÁNDEZ
B. Predoctorales / Graduate Students

MERCEDES HERNÁNDEZ DEL CERRO
Personal Técnico / Technician



Palabras clave: Fibronectina, Adhesión celular, Integrina $\alpha 4\beta 1$, Señalización intracelular, Apoptosis

Keywords: Fibronectin, Cell adhesion, $\alpha 4\beta 1$ integrin, Intracellular signaling, Apoptosis

Papel de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la organización del citoesqueleto en linfocitos

Role of $\alpha 4\beta 1$ integrin in lymphocyte cytoskeleton reorganization

Las interacciones de linfocitos con fibronectina (Fn) regulan muchas funciones celulares, como la reorganización del citoesqueleto, migración y supervivencia. El principal receptor de Fn en linfocitos es la integrina $\alpha 4\beta 1$, que reconoce la secuencia CS1 en Fn. Nuestro laboratorio ha demostrado que la activación exógena de $\alpha 4\beta 1$ con Mn^{2+} o el anticuerpo monoclonal anti- $\beta 1$ TS2/16, induce el reconocimiento de nuevas regiones en Fn, como el dominio Hep III. Hemos propuesto que Mn^{2+} y TS2/16 producen diferentes formas de activación de $\alpha 4\beta 1$. Actualmente estamos estudiando el efecto de estas formas sobre la organización de citoesqueleto obtenida por adhesión a fragmentos de Fn que contienen sitios de unión a células. Utilizando células T Jurkat, hemos encontrado que el Mn^{2+} induce una morfología polarizada, mientras que el TS2/16 induce extensión redondeada. La chondroitinasa inhibe parcialmente el efecto del Mn^{2+} pero no el del TS2/16. Además, sólo el TS2/16 activa la peque-

Lymphocyte interactions with fibronectin (Fn) regulate many cellular programmes including cytoskeleton reorganization, migration, and survival. The main lymphocyte receptor for Fn is the $\alpha 4\beta 1$ integrin, which recognizes the CS1 site in Fn. Our laboratory has demonstrated that exogeneous activation of $\alpha 4\beta 1$ with Mn^{2+} or the anti- $\beta 1$ mAb TS2/16 induces recognition of novel regions in Fn, such as the Hep III domain. We proposed that Mn^{2+} and TS2/16 produced different activation forms on $\alpha 4\beta 1$. We are currently studying whether these forms have different cytoskeletal effects upon adhesion to Fn fragments containing the various cell binding regions. Using Jurkat T cells, we have found that Mn^{2+} induced a polarized morphology while TS2/16 induced cell rounding and spreading. Chondroitinase partially inhibited the Mn^{2+} - but not the TS2/16-induced morphological pattern. Furthermore TS2/16 but not Mn^{2+} upregulated the small GTPase RhoA. Our studies indicate that the

ña GTPasa RhoA. Nuestros estudios indican que las diferentes formas de activación de $\alpha 4\beta 1$ inducen diferentes eventos intracelulares y que éstos se pueden regular por estímulos específicos.

Papel del dominio Hep III de Fn en la formación de fibras de estrés y adhesiones focales

La adhesión celular a Fn induce formación de fibras de estrés y contactos focales y esto requiere la interacción de $\alpha 5\beta 1$ con la secuencia RGD y la del síndecano-4 con el dominio Hep II. Nosotros estamos interesados en el papel del dominio Hep III y la integrina $\alpha 4\beta 1$ en esta reorganización del citoesqueleto. Estamos utilizando la línea celular de melanoma SKMEL-178, que expresa $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$. Las células SKMEL-178 formaban fibras de estrés y adhesiones focales después de su adhesión al fragmento FN-III7-10 (secuencia RGD) via $\alpha 5\beta 1$. La co-inmovilización del fragmento FN-III4-5 (contiene Hep III) con FN-III7-10, inhibía las fibras de estrés e inducía protrusiones citoplasmáticas y migración celular. $\alpha 4\beta 1$ es responsable de este efecto, como demostramos realizando mutaciones puntuales y utilizando otros ligandos como CS1 y VCAM-1. La ruta de señalización de $\alpha 4\beta 1$ incluía la fosforilación de p190RhoGAP y la inactivación de RhoA. Estos resultados indican que $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ proporcionan señales antagonicas, y que su función está regulada de forma compleja y coordinada.

Regulación de la apoptosis en células B por la integrina $\alpha 4\beta 1$

Estamos estudiando el papel de $\alpha 4\beta 1$ en la regulación de la apoptosis en líneas celulares derivadas de varias patologías B así como en la leucemia linfocítica crónica B (LLC-B). Hemos encontrado que la adhesión al fragmento H89 de Fn, un ligando de $\alpha 4\beta 1$, protege a algunas células B de la apoptosis inducida por privación de suero, pero no de la inducida via Fas o IgM de superficie. Nuestros resultados sugieren diferentes mecanismos intracelulares para estos procesos.

Con respecto a la LLC-B, un tipo común de leucemia en adultos, hemos estudiado si la interacción $\alpha 4\beta 1$ /H89 regula la resistencia al tratamiento característica de esta enfermedad. Las células LLC-B cultivadas sobre H89 durante el tratamiento con fludarabina, mostraban una viabilidad significativamente mayor que la de células cultivadas sobre el control poli-lisina, y

various $\alpha 4\beta 1$ activation forms induce different post-adhesion events and that these may be distinctly regulated by specific stimuli.

Role of Fn Hep III domain in stress fiber and focal contact formation

Cell attachment to Fn results in formation of stress fibers and focal adhesions and this requires $\alpha 5\beta 1$ integrin interaction with the RGD sequence and syndecan-4 binding to the Hep II domain. We are interested in studying the role of the Hep III domain and $\alpha 4\beta 1$ integrin on this cytoskeletal reorganization. We are using the melanoma cell line SKMEL-178, which expresses $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins, for these studies. Melanoma cells formed stress fibers and focal adhesions upon adhesion to the FNIII7-10 Fn fragment (RGD sequence) via $\alpha 5\beta 1$. Co-immobilization of FN-III4-5, a fragment spanning Hep III, with FN-III7-10 inhibited stress fibers and induced cytoplasmic protrusions and cell migration. We have found that $\alpha 4\beta 1$ integrin was responsible for this effect, based on point mutation experiments and the use of other $\alpha 4\beta 1$ ligands, such as VCAM-1 or CS1. The signaling pathway induced by $\alpha 4\beta 1$ consisted in phosphorylation of p190RhoGAP and downregulation of RhoA. These results indicate that $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ provide antagonistic signals, thus establishing a complex and coordinated regulation of integrin function.

Regulation of apoptosis in B cells by $\alpha 4\beta 1$ integrin

We are studying the role of $\alpha 4\beta 1$ in the regulation of apoptosis in established cell lines derived from various B malignancies as well as in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). We have found that adhesion to the Fn fragment H89, a ligand for $\alpha 4\beta 1$, protects some B cells from apoptosis induced by serum deprivation but not from that triggered via Fas or surface IgM. Our results therefore suggest different intracellular mechanisms for these processes.

With respect to B-CLL, a common type of adult leukemia, we have studied whether the $\alpha 4\beta 1$ /H89 interaction regulates the increased drug resistance characteristic of this disease. B-CLL cells cultured on H89 during treatment with fludarabine had significantly higher viability than cells cultured on the control poly-lisine and this correlated with increased expression of the anti-

esto se correlacionaba con una expresión aumentada de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL. Nuestros resultados indican que Bcl-xL participa en las señales de supervivencia inducidas por $\alpha 4\beta 1$ y contribuye a la progresiva resistencia a drogas terapéuticas observada en la LLC-B. Actualmente estamos estudiando otros mediadores de esta ruta de señalización como las proteinquininas FAK, Pyk2, PI3-K y Akt y sus inhibidores fisiológicos. También recientemente hemos empezado a estudiar otros aspectos de la LLC-B como la migración e infiltración de órganos por las células malignas, en particular el papel de metaloproteinasas y receptores de quimioquinas.

Identificación y caracterización de genes expresados diferencialmente en LLC-B

Nuestro laboratorio ha utilizado la técnica de expresión diferencial de mRNA para estudiar genes que tengan una expresión característica en la LLC-B. Hemos identificado el gen supresor tumoral RARRES-3 (gen de respuesta del receptor de ácido retinoico) como relacionado con la LLC-B, y hemos encontrado una correlación entre la disminución de la expresión de este gen y la progresión de la LLC-B. También existe una expresión disminuída de RARRES-3 en 10/10 casos de leucemia linfocítica aguda, lo que indica que este gen podría jugar un papel importante en la progresión de enfermedades linfoproliferativas.

apoptotic protein Bcl-xL. Our results indicate that Bcl-xL is involved in the survival signals induced by $\alpha 4\beta 1$ ligation and contributes to the progressive drug-resistance observed in B-CLL. Current work in the laboratory is aimed to determine other mediators of $\alpha 4\beta 1$ initiated signaling pathway including the protein-kinases FAK, Pyk2, PI3-K and Akt as well as their physiologic inhibitors. We also recently started to study other aspects of B-CLL such as malignant cell migration and organ infiltration, with emphasis on the role of metalloproteinases and chemokine receptors.

Identification and characterization of differentially expressed genes in B-CLL

Our laboratory has used the mRNA differential display technique to study genes which are differentially expressed in B-CLL. We have identified the tumor suppressor Retinoic Acid Receptor Responder 3 (RARRES-3) gene as a B-CLL related gene, and have found a correlation between down-regulation of RARRES-3 and progression of B-CLL. Decreased RARRES-3 expression was also observed in 10/10 cases of acute B lymphocytic leukemia indicating that this gene may play an important role in the progression of B lymphoproliferative disorders.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, SAF 2000-0124 (2000-2003)
- FIS, 01/1183 (2001-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Mercedes García Gila. Papel de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la regulación de apoptosis en células B y en el desarrollo del mieloma múltiple. Universidad Complutense de Madrid, 2001. Directora: Dra. Ma. Angeles García Pardo.
- José Vicente Moyano Idoeta. Adhesión celular al dominio de unión a heparina III de la fibronectina. Implicación en reorganización del citoesqueleto y migración celular. Universidad Autónoma de Madrid, 2002. Directora: Dra. Ma. Angeles García Pardo.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Casanova, B., de la Fuente, M.T., García-Gila, M., Sanz, L., Silva, A., García-Marco, J., and García-Pardo, A. (2001) The class II tumor-suppressor gene RARRES-3 is expressed in B lymphoid leukemias and down regulated with disease progression. *Leukemia*, 15, 1521-1526.
- Huang, W., Chiquet-Ehrismann, R., Moyano, J.V., García-Pardo, A., and Orend, G. (2001) Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res.* 61, 8586-8594.
- De la Fuente, M.T., Casanova, B., Moyano, J.V., García-Gila, M., Sanz, L., García-Marco, J., Silva, A., and García-Pardo, A. (2002) Engagement of $\alpha 4\beta 1$ integrin (CD49d/CD29) by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J. Leuk. Biol.* 71, 495-502.
- Esteban-Barragán, M.A., Avila, P., Álvarez-Tejado, M., Gutiérrez, M.D., García-Pardo, A., Sánchez-Madrid, F., and O. de Landázuri, M. (2002) Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in the formation of $\beta 1$ integrin fibrillar adhesions. *Cancer Res.* 62, 2929-2936.
- García-Gila, M., López-Martín, E.M., and García-Pardo, A. (2002) Adhesion to fibronectin via $\alpha 4$ integrin protects B cells from apoptosis induced by serum deprivation but not via IgM or Fas/Apo-1 receptors. *Clin. Exp. Immunol.* 127, 456-463.

Próximos artículos/ Forthcoming Articles

- Moyano, J.V., Maqueda, A., Albar, J.P., and García-Pardo, A. (2003). A synthetic peptide from the heparin-binding domain III (repeats III4-5) of fibronectin promotes stress fiber and focal adhesion formation in melanoma cells. *Biochem. J.*, 371, 565-571.
 - Moyano, J.V., Maqueda, A., Casanova, B., and García-Pardo, A. (2003). $\alpha 4\beta 1$ integrin/ligand interaction inhibits $\alpha 5\beta 1$ -induced stress fibers and focal adhesions via downregulation of RhoA and induces melanoma cell migration. *Mol. Biol. Cell* (en prensa/in press)
-

Biología Celular de las Moléculas de Adhesión

Cell Biology of Adhesion Molecules

JOAQUÍN TEIXIDÓ

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

M^a TERESA LAIN DE LERA (Desde III-2001 hasta III-2002)

M^a MAR ROBLEDO LÓPEZ (Hasta III-2001)
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

RUBÉN A. BARTOLOMÉ CONDE

DAVID GARCÍA BERNAL (Desde IX-2001)

MARIA LUISA PARMO CABANAS (Desde VII-2001)

NATALIA WRIGHT

B. Predoctorales / Graduate Students

Palabras clave: Adhesión celular, Integrinas, Quimioquinas, Mieloma, Melanoma

Keywords: Cell Adhesion, Integrins, Chemokines, Myeloma, Melanoma

Papel de la quimioquina SDF-1 en la modulación de la actividad de integrinas $\alpha 4$ en procesos fisiológicos y patológicos

Role of chemokine SDF-1 in the modulation of $\alpha 4$ integrin activity in physiology and disease.

Las integrinas $\alpha 4$ ($\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$) son moléculas de adhesión preferentemente expresadas en células del sistema inmune, que están implicadas en la extravasación leucocitaria durante la respuesta inmune y patologías inflamatorias, en hematopoyesis en médula ósea (MO), y en la recirculación linfocitaria entre órganos linfoides secundarios y sangre. Los principales ligandos de $\alpha 4\beta 1$ son VCAM-1 y la región CS-1 de la fibronectina (CS-1/FN). MAdCAM-1 constituye el principal ligando de $\alpha 4\beta 7$, aunque esta integrina interacciona también con VCAM-1 y con CS-1/FN.

The $\alpha 4$ integrins ($\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 7$) are adhesion molecules mainly expressed on immune cells which are involved in leukocyte extravasation during normal immune response and inflammatory pathologies, in hematopoiesis in bone marrow (BM) and in lymphocyte recirculation between secondary lymphoid organs and blood. The main ligands for $\alpha 4\beta 1$ are VCAM-1 and the CS-1 region of fibronectin (CS-1/FN). MAdCAM-1 is the principal ligand for $\alpha 4\beta 7$, though this integrin also interacts with VCAM-1 and CS-1/FN.

Las integrinas $\alpha 4$ se expresan en la membrana celular con baja capacidad adhesiva, la cual ha de ser activada por diferentes estímulos. La modulación de la adhesión dependiente de estas integrinas es esencial durante la migración transendotelial leucocitaria. Las quimioquinas forman una familia de citoquinas que están implicadas en migración y activación celular. La quimioquina SDF-1 (CXCL12) es un potente factor quimiotáctico para linfocitos y progenitores hematopoyéticos de MO, y realiza sus funciones tras unirse a su receptor CXCR4.

The $\alpha 4$ integrins are expressed on the cell membrane with a low adhesive capability, which has to be activated by different stimuli. Modulation of $\alpha 4$ integrin-dependent adhesion is essential for leukocyte transendothelial migration. Chemokines form a family of cytokines involved in cell migration and activation. The chemokine SDF-1 (CXCL12) is a potent chemotactic factor for lymphocytes and BM hematopoietic progenitors, and exerts its functions upon interaction with its receptor CXCR4.

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia caracterizada por la expansión de células plasmáticas malignas en la MO, las cuales se asocian a células estromales. $\alpha 4\beta 1$ participa en la adhesión de células de mieloma al estroma de MM en la MO. Hemos demostrado recientemente que las células de mieloma expresan CXCR4, y que SDF-1 aumenta rápida y transitoriamente la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en células de mieloma, lo cual puede representar un mecanismo importante de regulación del tráfico y/o localización de estas células en la médula ósea.

$\alpha 4\beta 1$, SDF-1 y CXCR4 juegan un papel crucial en la hematopoyesis en MO. Durante la hematopoyesis, las células multipotenciales hematopoyéticas CD34+ maduran hacia los distintos linajes de células sanguíneas, y son asimismo las encargadas de la reconstitución hematopoyética tras el trasplante de MO. Estas células expresan CXCR4 y $\alpha 4\beta 1$, por lo que analizamos si SDF-1 era capaz de modular la función de dicha integrina. Los resultados mostraron que SDF-1 modula la actividad adhesiva de $\alpha 4\beta 1$ en células CD34+, lo cual puede ser de gran importancia en procesos de migración de células progenitoras hematopoyéticas de médula transplantada.

Finalmente, hemos comprobado que SDF-1 es capaz de regular la adhesión a MAdCAM-1 y CS-1/FN dependiente de $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos CD4+ y en líneas celulares linfoides. Esta regulación puede jugar un papel importante en el tráfico linfocitario hacia el intestino y tejido linfoide asociado, tal como las Placas de Peyer.

Expresión y función de receptores de quimioquinas en células de melanoma

Durante la metástasis de células de melanoma, éstas migran a través de membranas basales desde los focos primarios, llegan hasta los vasos sanguíneos viajando a través de ellos, y posteriormente migran hacia otros tejidos para formar focos tumorales secundarios. Hemos iniciado un estudio dirigido a analizar la expresión y función de receptores de quimioquinas en células de melanoma, con el fin de investigar si estos receptores pueden participar en la migración y activación de estas células. Hemos mostrado recientemente que diferentes líneas celulares humanas de melanoma, así como células de melanoma metastásicas de nódulos linfáticos, expresan CXCR3 y CXCR4. Asimismo demostramos que Mig, un ligando para CXCR3, y SDF-1 acti-

Multiple myeloma (MM) is a neoplasia characterized by plasma cell expansion in BM, in association with stromal cells. $\alpha 4\beta 1$ mediates myeloma cell adhesion to MM stroma in the BM. We have recently demonstrated that myeloma cells express CXCR4, and that SDF-1 rapidly and transiently increases $\alpha 4\beta 1$ -dependent myeloma cell adhesion, which could represent an important regulatory mechanism for trafficking and localization of these cells in the BM.

$\alpha 4\beta 1$, SDF-1 and CXCR4 play a key role in hematopoiesis in the BM. During hematopoiesis, CD34+ multipotential hematopoietic cells mature towards different blood cell types, and are also responsible for hematopoietic reconstitution following BM transplant. As these cells express CXCR4 and $\alpha 4\beta 1$, we analyzed SDF-1 capability to modulate the function of this integrin. The results showed that SDF-1 controls the adhesive activity of $\alpha 4\beta 1$ in CD34+ cells, which could be crucial in the migration and lodging in the BM of transplanted hematopoietic progenitor cells.

Finally, we have shown that SDF-1 regulates $\alpha 4\beta 7$ -dependent CD4+ and lymphoid cell line adhesion to MAdCAM-1 and CS-1/FN. These regulation could play an important role lymphocyte trafficking towards intestine and associated lymphoid tissue, such as Peyer's patches.

Expression and function of chemokine receptors on melanoma cells

During metastasis, melanoma cells migrate across basement membranes, reach blood vessels, and travel in blood till they extravasate and form secondary tumour foci. We have initiated a study addressed to analyze expression and function of chemokine receptors in melanoma cells, to investigate if these receptors mediate their migration and activation. We have recently shown that different human melanoma cell lines and lymph node metastatic melanoma cells express CXCR3 and CXCR4. We also show that Mig, a ligand for CXCR3, and SDF-1 activate different intracellular signalling pathways and stimulate melanoma cell chemotaxis and adhesion to fibronectin. Functional expression of CXCR3 and CXCR4 on melanoma cells suggest that these receptors could contribute to cell motility during invasion, as well as to the regulation of cell proliferation and survival.

van diferentes rutas de señalización intracelular y estimulan quimiotaxis y adhesión de células de melanoma a fibronectina. La expresión de CXCR3 y CXCR4 funcionales en células de melanoma sugiere que estos receptores podrían contribuir a la motilidad celular durante procesos de invasión, así como a la regulación de proliferación y supervivencia celular.

Proyectos Financiados/Funding Agencies

- CM, 08.3/0024/1.98 (1999-2001)
- CICYT, SAF99-0057 (1999-2002)
- Almiral Prodesfarma, Contrato (2001-2002)
- FIS- MSyC, 01/1168 (2001-2004)
- CM, 08.3/0039/2001.1 (2002-2004)
- CICYT, SAF2002-00207: (2002-2005)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Hidalgo, A., Sanz-Rodríguez, F., Rodríguez-Fernández, J.L., Albella, B., Blaya, C., Wright, N., Prósper, F., Cabañas, C., Gutierrez-Ramos, J.C., and Teixidó, J. (2001) The chemokine stromal cell-derived factor-1_α modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 29, 345-355.
 - Robledo, M.M., Bartolomé, R.A., Longo, N., Rodríguez-Frade, J.M., Mellado, M., Longo, I., van Muijen, G.N.P., Sánchez-Mateos, P., and Teixidó, J. (2001) Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 276, 45098-45105.
 - Rodríguez-Fernández, J.L., Sánchez-Martín, L., Rey, M., Vicente-Manzanares, M., Narumiya, S., Teixidó, J., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C. (2001) Rho and ROCK modulate tyrosine kinase PYK2 in T cells through regulation of the activity of the integrin LFA-1. *J. Biol. Chem.* 276, 40518-40527.
 - Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A., and Teixidó, J. (2001) The chemokine stromal cell-derived factor-1_α modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 97, 346-351.
 - Sanz-Rodríguez, F., and Teixidó, J. (2001) VLA-4-dependent myeloma cell adhesion. *Leukemia and Lymphoma.* 41, 239-245.
 - Hidalgo, A., Robledo, M.M., and Teixidó, J. (2002) CD44-mediated hematopoietic progenitor cell adhesion and its complex role in myelopoiesis. *J. Hematol. Stem Cell Res.* 11, 539-548.
 - Wright, N., Hidalgo, A., Rodríguez-Frade, J.M., Soriano, S.F., Mellado, M., Pardo-Cabañas, M., Briskin, M.J., and Teixidó, J. (2002) The chemokine stromal cell-derived factor-1_α modulates α 4 β 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion to MAdCAM-1 and fibronectin. *J. Immunol.* 168, 5268-5277.
-

Metaloproteinasas de matriz en inflamación

Matrix Metalloproteinases in Inflammation

ALICIA GARCÍA ARROYO
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

BEATRIZ GONZÁLEZ GALVEZ
SALOMÓN MATÍAS ROMÁN
B. Predoctorales / Graduate Students

Palabras clave: Metaloproteinasas de matriz, Endotelio, Leucocito, Migración celular, Angiogénesis, Inflamación

Keywords: Matrix metalloproteinases, Endothelium, Leukocyte, Cell migration, Angiogenesis, Inflammation

Regulación de la metaloproteinasas de matriz MT1-MMP en células endoteliales humanas

Regulation of the matrix metalloproteinase MT1-MMP in human endothelial cells

La angiogénesis es el proceso biológico que lleva a la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes y se desarrolla en diversos estadios que incluyen la degradación local de la membrana basal subendotelial, la migración local y dirigida de las células endoteliales, la proliferación de dichas células, la canalización, ramificación y formación de nuevas estructuras vasculares así como la deposición de una nueva membrana basal. La angiogénesis es importante en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario y patológicos como la tumorigénesis o las enfermedades inflamatorias crónicas. Para el inicio de la angiogénesis se debe producir la transición de una célula endotelial quiescente y sin movimiento a una célula con fenotipo migratorio así como la degradación de la membrana basal subyacente. El endotelio emplea enzimas proteolíticas denominadas metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) para degradar los distintos componentes de la matriz extracelular. MT1-MMP es una MMP anclada a la membrana que desempeña un papel importante en proteólisis pericelular y también en angiogénesis. En nuestro grupo nos interesa estudiar los mecanismos moleculares que regulan la actividad de MT1-MMP en células endoteliales durante la respuesta angiogénica. Para ello se han generado anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio catalítico de MT1-MMP que han resultado ser inhibidores de su actividad proteolítica. Con estas herramientas hemos investigado la regulación de MT1-MMP por el estado migrato-

Angiogenesis is the biological process that leads to the formation of new vessels from preexisting ones and it is developed in different steps that include local degradation of the subendothelial basement membrane, local and directed migration of endothelial cells, proliferation of such cells, canalization, branching, and formation of new vascular structures as well as deposition of a new basement membrane. Angiogenesis is important for physiologic processes such as embryonic development as well as in pathology such as in tumorigenesis or chronic inflammatory disease. For the initiation of angiogenesis, it is required the transition from a quiescent and resting endothelial cell to a cell with a migratory phenotype and the degradation of the basement membrane underneath. The endothelium use proteolytic enzymes called matrix metalloproteinases (MMP) to degrade the variety of extracellular matrix components. MT1-MMP is a membrane-anchored MMP that plays a key role in pericellular proteolysis and also in angiogenesis. Our group is interested on studying the molecular mechanisms that regulate MT1-MMP activity in human endothelial cells during the angiogenic response. To that purpose, we have generated monoclonal antibodies directed against the catalytic domain of MT1-MMP that have resulted inhibitory of its proteolytic activity. By using these tools, we have investigated MT1-MMP regulation by the migratory state and the diverse components of the extracellular matrix

rio y por los distintos componentes de matriz extracelular que las células endoteliales pueden encontrarse durante la respuesta angiogénica. Así, hemos demostrado cómo la migración induce un aumento de la expresión y actividad de MT1-MMP así como su relocalización a estructuras móviles en las células endoteliales. Además, hemos observado cómo la interacción mediada por diferentes integrinas del endotelio con distintos componentes de la matriz extracelular como gelatina y colágeno tipo I regulan de forma diferencial la localización subcelular, la internalización, la expresión y la actividad de MT1-MMP. Recientemente hemos caracterizado una nueva ruta para la internalización de MT1-MMP en células endoteliales humanas dependiente de caveolae y hemos determinado cómo la internalización mediada por estos microdominios es crítica para una función adecuada de MT1-MMP en angiogénesis.

Regulación de la metaloproteinasas de matriz MT1-MMP en leucocitos humanos

En la respuesta inflamatoria los leucocitos necesitan atravesar el endotelio, la membrana basal y la matriz intersticial para alcanzar los focos inflamatorios tisulares. Durante este proceso, el leucocito se encuentra con varias barreras que incluyen las fuertes uniones entre las células endoteliales así como la matriz extracelular subyacente. Se sabe que las MMPs desempeñan una función importante en la migración e invasión de células tumorales en los tejidos. Por homología, se ha especulado que los leucocitos podrían utilizar mecanismos proteolíticos similares para invadir los tejidos inflamatorios. Sin embargo, el posible papel funcional de las MMPs en el proceso de trans migración leucocitaria no se ha investigado en detalle. Nuestro grupo pretende caracterizar la expresión de MT1-MMP en los distintos tipos de leucocitos así como estudiar sus posibles mecanismos de regulación y sobre todo su posible función durante la trans migración leucocitaria. Hasta el momento, hemos observado cómo la expresión de MT1-MMP puede inducirse en líneas celulares mieloides como U937 y THP-1 por ésteres de forbol y/o lipopolisacárido. Además, hemos demostrado cómo la adhesión a la proteína de matriz extracelular fibronectina o a una monocapa de células endoteliales induce/aumenta la expresión de MT1-MMP en monocitos humanos aislados de sangre periférica. Se está caracterizando en este momento la localización subcelular de la proteasa en monocitos migratorios y en líneas mieloides transfectadas establemente con MT1-MMP-GFP así como su

that endothelial cells can find during the angiogenic response. Thus, we have demonstrated that migration induces an increase in MT1-MMP expression and activity as well as its relocalization to motile structures in human endothelial cells. Moreover, we have observed that the integrin-mediated interaction of endothelial cells with different extracellular matrix components such as gelatin or collagen type I distinctly regulates MT1-MMP subcellular localization, internalization, expression, and activity. Recently, we have characterized a novel pathway for MT1-MMP internalization caveolae-dependent in endothelial cells and we have determined that this microdomain-mediated internalization is critical for a proper function of MT1-MMP in angiogenesis.

Regulation of the matrix metalloproteinase MT1-MMP in human leukocytes

In the inflammatory response, leukocytes need to go through the endothelial monolayer, the basement membrane, and the interstitial matrix to reach the tissue inflammatory foci. During this process, the leukocyte find several barriers that include the junctions between endothelial cells as well as the subendothelial extracellular matrix. It is known that MMP play an important function in tumor cell migration and invasion into tissues. Likely, it has been hypothesized that leukocytes might use similar proteolytic mechanisms to invade into inflammatory tissues. However, the putative functional role of MMPs during leukocyte transendothelial migration has not been investigated in detail. Our group aims to characterizing MT1-MMP expression in different leukocyte subsets as well as studying the possible mechanisms of regulation and most of all its putative role during leukocyte transmigration. So far, we have observed that MT1-MMP expression can be induced in myeloid cell lines such as U937 and THP-1 by phorbol esters and/or lipopolysaccharide. Moreover, we have demonstrated that the adhesion to the extracellular matrix protein fibronectin or to an endothelial monolayer induces/increases MT1-MMP expression in human monocytes from peripheral blood. We are currently analyzing the subcellular localization of the protease in migratory monocytes and in myeloid cell lines stably transfected with MT1-MMP-GFP as well as its proteolytic activity and its possible function during the migration of such cells.

actividad proteolítica y su posible función durante la migración de dichas células.

Función de MT1-MMP en angiogénesis y tráfico leucocitario durante la inflamación

MT1-MMP parece desempeñar un papel importante durante la respuesta angiogénica como demuestra la disminución de la inducción de vasos en el modelo de córnea de ratón en ratones deficientes para MT1-MMP. Sin embargo, no se conocen en detalle los estadios en los que MT1-MMP podría estar participando. Con los anticuerpos monoclonales inhibidores obtenidos en el laboratorio hemos demostrado cómo la actividad de MT1-MMP es importante en la migración de células endoteliales sobre distintos sustratos de matriz extracelular cooperando con los receptores de adhesión integrinas; en la invasión de células endoteliales a través de geles de colágeno tipo I y de fibrina; y además en la formación de tubos capilares en el sistema de Matrigel *in vitro*. Ahora estamos explorando la posible función de MT1-MMP en un modelo de angiogénesis *in vivo* en ratón mediante la inyección subcutánea de Matrigel. Se estudiará también si MT1-MMP puede participar de forma diferencial en la angiogénesis inducida por factores de crecimiento como VEGF en comparación con quimiocinas angiomoduladoras que pueden ser importantes en inflamación como SDF-1, IL-8, o MCP-1. Por otra parte, como hemos comentado anteriormente se desconoce si MT1-MMP puede participar en la migración transendotelial de leucocitos durante la inflamación. Por ello, se testará el efecto de los anticuerpos anti-MT1-MMP bloqueantes en la migración de monocitos humanos sobre matriz extracelular, en la invasión de monocitos a través de matrices como Matrigel y colágeno tipo I así como en la transmigración de monocitos a través de endotelio. La posible participación de MT1-MMP en estas funciones *in vitro* se corroborará mediante ensayos *in vivo* de reclutamiento leucocitario inducido por quimiocinas inflamatorias en ratón (modelos de 'air pouch' y/o inyección intraperitoneal de quimiocinas). Con estos estudios conseguiremos desvelar nuevos mecanismos moleculares implicados tanto en el reclutamiento leucocitario como en la angiogénesis inducida durante la inflamación y con ello aportaremos información que podría ser relevante a la hora de diseñar agentes bloqueantes de MT1-MMP para su posible aplicación terapéutica en enfermedades inflamatorias crónicas.

MT1-MMP function in angiogenesis and leukocyte traffic during inflammation

*MT1-MMP seems to play an important role during the angiogenic response as shown by the decrease in the induction of vessels in the mouse cornea model in mice deficient for MT1-MMP. However, it is not known yet the steps in which MT1-MMP might be participating. By using the inhibitory monoclonal antibodies obtained in the lab, we have shown that MT1-MMP activity is important in endothelial cell migration on different extracellular matrix substrates cooperating with the adhesion receptors integrins; in endothelial cell invasion through collagen type I and fibrin gels; and moreover, in the formation of capillary tubes in Matrigel *in vitro*. We are currently exploring the putative MT1-MMP function in an *in vivo* model of angiogenesis by injecting Matrigel subcutaneously in mice. The differential participation of MT1-MMP in the angiogenesis induced by growth factors such as VEGF in comparison with angiomodulating chemokines likely important in inflammation such as SDF-1, IL-8, or MCP-1 will also be analyzed. On the other hand, as aforementioned it is unknown yet whether MT1-MMP can participate in leukocyte transendothelial migration during inflammation. For this, the effect of blocking anti-MT1-MMP antibodies in human monocyte migration on extracellular matrix, in the invasion of monocytes through matrices such as Matrigel or collagen type I as well as in monocyte transendothelial migration will be tested. The possible participation of MT1-MMP during these functions *in vitro* will be confirmed by *in vivo* assays in mice of leukocyte recruitment induced by inflammatory chemokines ('air pouch' model and/or intraperitoneal injection of chemokines). With these studies, we will try to unravel novel molecular mechanisms involved in both leukocyte recruitment and in angiogenesis induced during the inflammation and so we could provide information that might be relevant for the design of MT1-MMP blocking agents and for their possible therapeutic application in chronic inflammatory disease.*

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- FIS, 00/0114 (2000-2002)
- CAM, 08.3/0003.1/2000 (2001)
- CAM, 08.3/0015.1/2001 (2002)
- Biogen Inc. (2002-)
- MCYT, SAF2002-00068 (2002-2005)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Gálvez, B.G., Matías-Román, S., Albar, J.P., Sánchez-Madrid, F., and Arroyo, A.G. (2001) Membrane type-1 matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J. Biol. Chem.* 276, 37491-37500.
- Gálvez, B.G., Matías-Román, S., Yáñez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F., and Arroyo, A.G. (2002) ECM regulates MT1-MMP localization with $\beta 1$ or $\alpha v\beta 3$ integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 159, 509-521.
- Lara-Pezzi, E., Gómez-Gaviro, M.V., Gálvez, B.G., Mira, E., Iñiguez, M.A., Fresno, M., Martínez-Alonso, C., Arroyo, A.G., and López-Cabrera, M. (2002) The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J. Clin. Invest.* 110, 1831-1838.
- Toth, M., Hernández-Barrantes, S., Osenkowski, P., Bernardo, M.M., Gervasi, D.C., Shimura, Y., Merohue, O., Kotra, L.P., Gálvez, B.G., Arroyo, A.G., Mobashery, S., and Fridman, R.I. (2002) Complex pattern of membrane type 1-matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cell surface inactivation of active enzyme. *J. Biol. Chem.* 277, 26340-26350.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Gálvez, B.G., Matías-Román, S., Yáñez-Mó, M., Vicente-Manzanares, V., Sánchez-Madrid, F., and Arroyo, A.G. (2003) Caveolae are a major pathway for MT1-MMP traffic in human endothelial cells regulated by Rho A. (en prensa/in press)

Artículos de Divulgación/Press Articles

- Arroyo, A.G. (2001) Integrins: What are they doing on leukocytes in vivo? *Inmunología* 20, 78-87.

Contribuciones a libros/Contributions to books

- Matías-Román, S., Gálvez, B.G., and Arroyo, A.G. (2003). Matrix metalloproteinases in leukocyte transendothelial migration (en prensa/in press).
-

Receptores de Membrana *Membrane Receptors*

CARMELO BERNABÉU QUIRANTE
Jefe de Grupo / Group Leader

LUISA MARÍA BOTELLA
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

MERCEDES GUERRERO ESTEO (Desde I a XI-2002)
FRANCISCO SANZ RODRÍGUEZ
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

FRANCISCO JAVIER BLANCO LÓPEZ (Desde VII-2001)
MERCEDES GUERRERO ESTEO (Desde I a XII-2001)
TILMAN SÁNCHEZ ELSNER (Hasta IX-2002)
B. Predoctorales / Predoctoral Fellows

CARMEN LANGA POZA
Personal Técnico / Technician



Palabras clave: TGF-beta, Endogлина, Endotelio, Patología vascular

Endogлина, un receptor auxiliar del TGF-beta implicado en el remodelado vascular y desarrollo cardiovascular

Miembros de la superfamilia del TGF-beta ejercen sus funciones biológicas a través de receptores de membrana conocidos como serina/treonina quinasas tipo I (TbetaRI) y tipo II (TbetaRII). Después de unir ligando, el TbetaRII recluta y fosforila al TbetaRI, el cual inicia la vía de señalización mediante fosforilación de la familia de proteínas Smad. Endogлина es una glicoproteína homodimérica de membrana que funciona, en asociación con TbetaRI y TbetaRII, como un receptor auxiliar para TGF-beta1, TGF-beta3, activina, BMP-2, y BMP-7. Está altamente expresada en células endoteliales, y en menores niveles en monocitos activados/macrófagos, así como en células mesenquimales, incluyendo fibroblastos, y células vasculares de músculo liso.

Endogлина juega un papel importante en el remodelado vascular y en el desarrollo cardiovascular. La expresión de endogli-

Keywords: TGF-beta, Endoglin, Endothelium, Vascular pathology

Endoglin, an auxiliary receptor for TGF-beta involved in vascular remodeling and cardiovascular development.

Members of the TGF-beta superfamily exert their biological functions through membrane receptors known as type I (TbetaRI) and type II (TbetaRII), serine/threonine kinases. After ligand binding, TbetaRII recruits and phosphorylates TbetaRI, which initiates the signaling pathway by phosphorylating the Smad family of proteins. Endoglin is a homodimeric membrane glycoprotein which functions, in association with TbetaRI and TbetaRII, as an auxiliary receptor for TGF-beta1, TGF-beta3, activin, BMP-2, and BMP-7. It is highly expressed by endothelial cells, and at lower levels by activated monocytes/macrophages, as well as by mesenchymal cells, including fibroblasts, and vascular smooth muscle cells.

Endoglin plays an important role in vascular remodeling and cardiovascular development. Endoglin expression is regulated during heart development in humans and chicken; it is

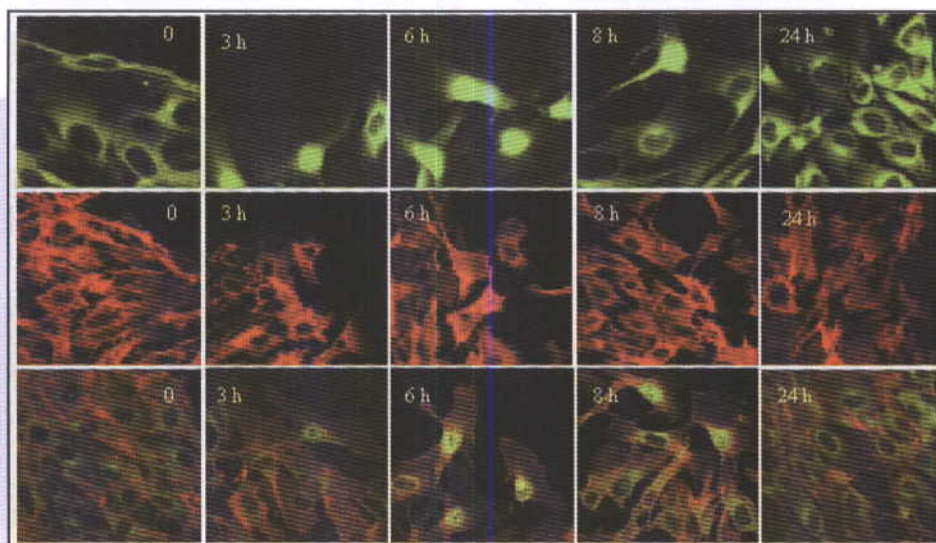


Figura: El factor de transcripción KLF6 (verde) se encuentra en el citoplasma de las células endoteliales en condiciones quiescentes (tiempo 0). Como consecuencia de una herida en la monocapa endotelial, KLF6 se trasloca al núcleo (3 y 8 h) para aumentar la expresión de endoglina (rojo) en la superficie celular. A tiempos más largos, KLF6 vuelve al citoplasma (24h)

na está regulada durante el desarrollo del corazón en humanos y en pollo; está altamente expresada en el endocardio durante la formación de la válvula y en las células mesenquimales del canal atrioventricular durante la formación del septo del corazón. Su papel en la morfogénesis se ha visto confirmado por el hallazgo de que embriones de ratones homocigotos para un mutante de endoglina mueren a los 10-10.5 días postcoitum debido a anomalías vasculares y cardíacas.

El gen que codifica para endoglina es también la diana para un desorden autosómico dominante conocido como Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 1 (HHT1) (síndrome de Osler-Weber-Rendu). Las manifestaciones más comunes de HHT1 son el desarrollo de telangiectasias vasculares en la piel y en la mucosa nasal con sangrados, así como malformaciones arteriovenosas en pulmón, hígado, y cerebro. Los niveles reducidos de endoglina funcional (haploinsuficiencia), en lugar de un efecto dominante-negativo del alelo mutante, están

highly expressed at the level of endocardial cushion during valve formation and by the mesenchymal cells of the atrioventricular canal during heart septation. Its role in morphogenesis is further underscored by the finding that mice embryos homozygous for a mutant endoglin die at 10-10.5 days postcoitum due to vascular and cardiac anomalies.

The gene encoding endoglin is also the target for the autosomal dominant disorder known as hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT1) (Osler-Weber-Rendu syndrome). The most common clinical manifestations of HHT1 are the development of vascular telangiectases in skin and nasal mucosa with bleeding as well as arteriovenous malformations in lung, liver, and brain. Reduced levels of functional endoglin (haploinsufficiency), rather than a dominant-negative effect of the mutant allele is widely accepted as the pathogenic mechanism of HHT1. For this reason, studies elucidating the regulation of endoglin gene expression, as well as the function and structure

Organismos financiadores/Funding Agencies

- MCYT, SAF2000-0132 (2000-2003)
- CAM, 08.4/0029/2000 1 (2001-2002)
- FIS, PI020200 (2002-2005)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Mercedes Guerrero-Esteo. Identificación de proteínas que interaccionan con los dominios extracelular e intracelular de endoglina. Universidad Autónoma de Madrid, 2001. Director: Dr. Carmelo Bernabéu Quirante.
- Tilman Sánchez-Elsner. Cooperación entre las señales inducidas por hipoxia y TGF-beta en la transcripción génica. Universidad Complutense de Madrid, 2002. Directores: Drs. Carmelo Bernabéu Quirante y Luisa Maria Botella Cubells.
- Juana de Lorenzo. Proteína de Stress Hsp 70 como marcador biológico discriminante de Respuestas emocionales. Universidad Complutense de Madrid, 2002. Codirectora: Dra. Luisa Maria Botella Cubells.
- Gertrudis Cabello. Efecto de pesticidas organofosforados sobre la proliferación y transformación de células de glándula mamaria. Universidad Autónoma de Madrid, 2002. Co-Directora: Dra. Luisa Maria Botella Cubells

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Botella, L.M., Sánchez-Elsner, T., Rius, C., Corbí, A., and Bernabéu, C. (2001) Identification of a critical SP1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J. Biol. Chem.* 276, 34486-34494.
- Hidalgo, A., Sanz-Rodríguez, F., Rodríguez-Fernández, J.L., Albella, B., Blaya, C., Wright, N., Cabanas, C., Prosper, F., Gutierrez-Ramos, J.C., and Teixidó, J. (2001) Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 29, 345-355.
- Li, C., Guo, B., Bernabéu, C., and Kumar, S. (2001) Angiogenesis in breast cancer: The role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc. Res. Tech.* 52, 437-449.
- Martínez, J.L., Sánchez-Elsner, T., Morcillo, G., and Díez, J.L. (2001) Heat shock regulatory elements are present in telomeric repeats of *Chironomus thummi*. *Nucleic Acids Res.* 29, 4760-4766.
- Puig-Kröger, A., Relloso, M., Fernández-Capetillo, O., Zubiaga, A., Silva, A., Bernabéu, C., and Corbí, A.L. (2001) Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotype and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98, 2175-2182.
- Rodríguez-Barbero, A., Obreo, J., Eleno, N., Rodríguez-Pena, A., Duwel, A., Jerkic, M., Sánchez-Rodríguez, A., Bernabéu, C., and López-Novoa, J.M. (2001) Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by *tgf-beta1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 142-7.
- Rodríguez-Peña, A., Prieto, M., Duwell, A., Rivas, J.V., Eleno, N., Pérez-Barriocanal, F., Arévalo, M., Smith, J.D., Vary, C.P., Bernabéu, C., and López-Novoa, J.M. (2001) Up-regulation of endoglin, a TGF- β binding protein, in rats with experimental renal

fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrol. Dial. Transpl.* 16, 34-39.

- Sánchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Corbí, A., Attisano, L., and Bernabéu, C. (2001) Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J. Biol. Chem.* 276, 38527-38535.
- Sanz-Rodríguez, F., and Teixidó, J. (2001) VLA-4-dependent myeloma cell adhesion. *Leuk. Lymphoma.* 41, 239-245.
- Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A., and Teixidó, J. (2001) Chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood.* 97, 346-351.
- Velasco, B., Ramírez, J.R., Relloso, M., Li, C., Kumar, S., López-Bote, J.P., Pérez-Barriocanal, F., López-Novoa, J.M., Cowan, P.J., d'Apice, A.J.F., and Bernabéu, C. (2001) Vascular gene transfer driven by endoglin and ICAM-2 endothelial specific promoters. *Gene Therapy* 8, 897-904.
- Botella, L.M., Sánchez-Elsner, T., Sanz-Rodríguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman M. P., Ratziu, V., Langa, C., Vary, C.P., Ramírez, J.R., Friedman, S., and Bernabéu, C. (2002) Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6; their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 100, 4001-4010.
- Díez-Marques, L., Ortega-Velázquez, R., Langa, C., Rodríguez-Barbero, A., López-Novoa, J.M., Lamas, S., and Bernabéu, C. (2002) Expression of endoglin in human mesangial cells. Modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1587, 36-44.
- Guerrero-Esteo M, Sánchez-Elsner T., Letamendia A., and Bernabéu C. (2002) Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J. Biol. Chem.* 277, 29197-29209.
- Leask, A., Abraham, D.J., Finlay, D.R., Holmes, A., Pennington, D., Shi-Wen, X., Chen, Y., Venstrom, K., Dou, X., Ponticos, M., Black, C., Bernabéu, C., Jackman, J.K., Findell, P.R., and Connolly, M.K. (2002) Dysregulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma: overexpression of endoglin in cutaneous scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 46, 1857-1865. Erratum en *Arthritis Rheum.* 46 (10), page 2830.
- Rodríguez-Barbero, A., Obreo, J., Yuste, L., Montero, J.C., Rodríguez-Peña, A., Pandiella, A, Bernabéu, C., and López-Novoa, J.M. (2002) Transforming growth factor- β 1 induces collagen synthesis and accumulation via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in cultured L6E9 myoblasts. *FEBS Lett.* 513, 282-288.
- Rodríguez-Peña, A., Eleno, N., Duwell, A., Arévalo, M., Pérez-Barriocanal, F., Flores, O., Docherty, N., Bernabéu, C., Letarte, M., and López-Novoa, J.M. (2002) Endoglin Upregulation During Experimental Renal Interstitial Fibrosis in Mice. *Hypertension* 40, 713-720.
- Sánchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Langa, C., and Bernabéu, C. (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 43799-43808.

Biología de las Células Mieloides

Myeloid Cell Biology

ÁNGEL LUIS CORBÍ LÓPEZ
Jefe de Grupo/ Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

ESTHER CAPARRÓS (Desde VII-2002)
Investigador visitante / Visiting scientist

AMAYA PUIG KRÖGER
MIGUEL RELLOSO CERECEDA (Hasta X-2001)
Becarios Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

ÁNGELES DOMÍNGUEZ SOTO
OSCAR MUÑOZ PELLO
DIEGO SERRANO GÓMEZ
Becarios Predoctorales / Predoctoral Fellows



Palabras clave: Regulación de la expresión génica; Adhesión celular; Integrinas; Células dendríticas; Reconocimiento de patógenos; DC-SIGN

Vías de señalización intracelular y factores de transcripción implicados en la diferenciación y maduración de células dendríticas humanas

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno especializadas, que actúan como “centinelas” del sistema inmune y son esenciales para el inicio de la respuesta inmune primaria. La singularidad de las células dendríticas radica en su capacidad de estimular linfocitos T vírgenes. Además, las células dendríticas juegan un papel esencial en la polarización de los linfocitos con los que interactúan, controlando el tipo de respuesta inmune (celular, humoral o tolerancia). Nuestro laboratorio ha puesto de manifiesto el efecto regulador opuesto que las quinasas ERK1/2 y p38MAPK ejercen sobre la maduración funcional y fenotípica de células dendríticas derivadas de monocitos. Asimismo hemos identificado una serie de genes regulados durante dicho proceso, entre los que destacan la integrina CD49d (receptor de fibronectina) y el factor de transcripción AML-2, implicado en un alto porcentaje de cánceres gástricos y

Keywords: Regulation of gene expression; Cell adhesion; Integrins; Dendritic cells; Pathogen recognition; DC-SIGN

Signaling pathways and transcription factors involved in dendritic cell differentiation and maturation.

Dendritic cells are specialized antigen-presenting cells which are critically implicated in the triggering and regulation of primary immune responses, and which exhibit the unique ability of stimulating naive T lymphocytes. Besides, dendritic cells play a key role in T lymphocyte polarization, thus controlling the final outcome of the immune response (cellular, humoral, tolerance). Our group has demonstrated that ERK1/2 and p38MAPK kinases exert opposite effects on the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived dendritic cells. We have identified a number of genes whose expression is regulated during dendritic cell maturation, which include the fibronectin receptor CD49d integrin and the AML-2 transcription factor. With the aim of dissecting the monocyte-dendritic cell transition, we have also identified myeloid cell lines with IL-4-dependent dendritic cell differentiation ability. Our results will contribute to the development and improvement of techniques to manipulate the immune system in situations where its activity should be

que funciona como gen supresor de tumores en otros tipos celulares. Con objeto de diseccionar en proceso de transición monócito-célula dendrítica, hemos determinado la existencia de líneas celulares mieloides con diferenciación dendrítica inducible por interleucina-4 (IL-4). Nuestros resultados pueden contribuir al desarrollo y la optimización de las técnicas de manipulación del sistema inmune en casos en los que su actividad haya de ser inducida/potenciada (desarrollo de vacunas, inmunoterapia antitumoral) o reprimida (enfermedades autoinmunes, trasplantes).

Expresión de moléculas de adhesión: Influencia del estado de proliferación/diferenciación celular y de proto-oncogenes

Las funciones leucocitarias durante las respuestas inmune e inflamatoria y la capacidad metastásica de leucemias y linfomas son absolutamente dependientes de mecanismos de adhesión y migración transendotelial mediados por las integrinas leucocitarias CD11a,b,c/CD18. Nuestros estudios están centrados en la identificación de las secuencias reguladoras y los factores nucleares implicados en la transcripción leucocito-específica y desarrollo-dependiente de los genes que codifican las integrinas CD11a y CD11c. Durante los dos últimos años hemos demostrado que la expresión de la integrina CD11a en células linfoides es dependiente del factor de transcripción AML-1, mientras que su expresión en células mieloides es controlada por los factores C/EBP y AML-2, según el estado de diferenciación celular. Estos estudios nos han conducido a la identificación de una nueva isoforma del factor AML-2 que exhibe actividad represora y cuya expresión hemos detectado en numerosos tipos celulares. El establecimiento de transfectantes estables de diferentes isoformas de AML-2 en células mieloides de diferenciación inducible nos ha permitido poner de manifiesto su papel sobre la expresión de la integrina CD11a. Asimismo hemos determinado el efecto negativo que la expresión de la molécula quimérica AML1/eto, producto de la translocación t(8;21) de numerosas leucemias mieloides, tiene sobre la transcripción del gen que codifica para la integrina CD11a.

Regulación de la expresión y relaciones estructura/función en la molécula DC-SIGN

La molécula DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin) es una lectina de membrana de tipo C y de expresión preferencial en células dendrítica mieloides. DC-

potentiated (vaccines, cancer immunotherapy) or repressed (autoimmune diseases, transplant rejection).

Adhesion molecule expression: Influence of proto-oncogenes and the state of cellular proliferation/differentiation.

Leukocyte functions during immune and inflammatory responses are absolutely dependent on adhesion and transmigration processes which are mediated by the leukocyte integrins CD11a,b,c/CD18. Our studies are focussed on the identification of the DNA regulatory elements and transcription factors which govern the leukocyte-specific and development-regulated expression of the CD11a and CD11c integrins. In the last two years we have demonstrated that CD11a integrin expression in lymphoid cells is controlled by the AML1 transcription factor, while C/EBP and AML-2 factors direct its expression in cells of the myeloid lineage. These findings have allowed us the identification of a previously unreported isoform of AML-2 which functions as a transcriptional repressor. We have generated stable transfectants of distinct AML2 isoforms in myeloid cells in order to fully demonstrate their effects on the CD11a expression and other integrin-dependent adhesive functions. Finally, we have determined the negative regulatory effect that the AML1/eto molecule, derived from the t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia, has on the CD11a integrin gene transcription.

Expression and structure/function relationships in the DC-SIGN molecule.

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin) is a transmembrane C-type lectin preferentially expressed on myeloid dendritic cells. DC-SIGN mediates interactions between dendritic cells and naive T lymphocytes (at the initiation of immune responses) or endothelial cells (during dendritic cell migration towards peripheral lymph nodes). DC-SIGN also functions as a pathogen-associated molecular pattern receptor, and is involved in the initial stages of HIV infection. Our group has generated a monoclonal antibody against DC-SIGN which inhibits both its adhesive and pathogen recognition functions. The use of this antibody and DC-SIGN transfectants have been instrumental in the demonstration, carried out in collaboration with other groups, that DC-SIGN is also a

SIGN media las interacciones de células dendríticas con linfocitos T vírgenes, así como con células endoteliales durante su migración hacia los nódulos linfáticos. Además, DC-SIGN funciona como receptor de patógenos, estando implicada en las etapas iniciales de infección por HIV. Nuestro laboratorio ha generado un anticuerpo monoclonal frente a DC-SIGN que bloquea todas sus interacciones adhesivas y de reconocimiento. Mediante el empleo de este anticuerpo hemos podido determinar, en colaboración con otros grupos, que DC-SIGN funciona como receptor específico para el virus Ebola y amastigotes del parásito *Leishmania*. Por otra parte, el anticuerpo nos ha permitido determinar que la expresión de DC-SIGN es inducible por IL-4 en monocitos, así como las vías de señalización que median dicha inducción. En la actualidad estamos analizando las relaciones estructura/función en DC-SIGN mediante la evaluación de las actividades funcionales de transfectantes estables de diferentes isoformas de DC-SIGN que se expresan de manera normal en células dendríticas derivadas de monocitos.

specific receptor for Ebola virus and for amastigotes of the Leishmania parasite. On the other hand, we have determined the inducibility of DC-SIGN expression by IL-4, as well as the intracellular signalling pathways which participate in the process. At present we are analyzing structure/function relationships in the DC-SIGN molecule through the evaluation of the functional activities displayed by cells stably transfected with naturally occurring isoforms of the molecule.

Organismos financiadores / Funding Agencies

- CICYT, SAF98-0068 (1998-2001)
- Comunidad Autónoma de Madrid, 08.2/0035.1/99 (2000-2001)
- FIS 01/0063-01 (2001-2003)
- Comunidad Autónoma de Madrid, 08.3/0026/2000 1 (2001-2002)
- MCYT, SAF2002-04615-C02-01 (2003-2006).
- Fundación Renal Iñigo Alvarez de Toledo/Baxter Healthcare, "Células dendríticas y diálisis peritoneal" (2001-2003).

Tesis Doctorales / Doctoral Theses

- AMAYA PUIG KRÖGER : Identificación de las vías de señalización e integrinas implicadas en la maduración de células dendríticas humanas y regulación transcripcional de la integrina CD11a.
Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, Marzo de 2002
CALIFICACIÓN: Apto "cum laude".

Patentes / Patents

- Angel L. Corbí, Luis Rivas, María Colmenares y Miguel Relloso (2002). Nuevo compuesto terapéutico para el tratamiento de la infección con *Leishmania*. Número de patente: ES200201436.

Publicaciones / Publications

Artículos en Revistas / Journal Articles

- Botella, L.M., Sánchez-Elsner, T., Rius, C., Corbí, A.L., and Bernabéu, C. (2001) Identification of a critical SP1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J. Biol. Chem.* 276, 34486-34494.
- Corbí, A.L., Relloso, M., and Puig-Kröger, A. (2001) Células dendríticas, Biología, funciones efectoras y utilidad terapéutica antitumoral. *Hematol. Citocinas Immunoter. Ter. Cel.* 4, 45-71.
- Puig-Kröger, A., Relloso, M., Fernández-Capetillo, O., Zubiaga, A., Silva, A., Bernabéu, C., and Corbí, A.L. (2001) Extracellular signal-Regulated protein Kinase (ERK) signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98, 2175-2182.
- Sánchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Corbí, A.L., Attisano, L., and Bernabéu, C. (2001) Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J. Biol. Chem.* 276, 38527-38535.
- Álvarez, C.P., Carrillo, J., Muñiz Pello, O., Corbí, A.L., and Delgado, R. (2002) C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus. *J. Virol.* 76, 6841-6864.
- Colmenares, M., Puig-Kröger, A., Muñiz Pello O., Corbí, A.L., and Rivas, L. (2002) DC-SIGN is a receptor for *Leishmania pifanoi* amastigotes in human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 277, 36766-36769.
- Melero, I., Gabari, I., Corbí, A.L., Relloso, M., Mazzolini, G., Schmidt, V., Rodríguez-Calvillo, M., Tirapu, I., Carnafeita, E., Albar, J.P., and Prieto, J. (2002) An anti-ICAM-2 (CD102) monoclonal antibody induces immune-mediated complete regressions of transplanted ICAM-2-negative colon carcinomas. *Cancer Res.* 62, 3167-3174.
- Corbí, A.L., Puig-Kröger, A. (2002) Transcriptional and signaling mechanisms during dendritic cell differentiation and maturation. *Inmunología* 21, 228-248.
- Relloso, M., Puig-Kröger, A., Muñiz-Pello, O., Rodríguez-Fernández, J.A., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Muñoz-Fernández, M.A., Sánchez-Mateos, P., and Corbí, A.L. (2002) DC-SIGN (CD209) expression is IL-4-dependent and is negatively regulated by IFN, TGF- β and anti-inflammatory agents. *J. Immunol.* 168, 2634-2643.
- Urzainqui, A., Serrador, J.M., Viedma, F., Yañez-Mo, M., Rodríguez, A., Corbí, A.L., Alonso-Lebrero, J.L., Luque, A., Deckert, M., Vázquez, J., Sánchez-Madrid, F. (2002) ITAM-Based Interaction of ERM Proteins with Syk Mediates Signaling by the Leukocyte Adhesion Receptor PSGL-1. *Immunity* 17, 401-412.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Puig-Kröger, A., Selgas, R., Bajo, M.A., Sánchez-Tomero, J.A., Alvarez, V., del Peso, G., Sánchez-Mateos, P., Holmes, C.J., Faict, D., López-Cabrera, M., and Corbí, A.L. (2003) Peritoneal dialysis solutions differentially impair the phenotypic and functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells, inhibitory effect of lactate. *J. Leuk. Biol.* (en prensa/in press).
-

Genómica Computacional

Computational Genomics

MIGUEL ANGEL VEGA PALACIOS
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

NATIVIDAD RUIZ VELASCO (Hasta V-2002)
B. Predoctoral / Graduate Student

Palabras clave: Aterosclerosis, Receptores scavenger, Bioinformática, Genes

Keywords: Atherosclerosis, Scavenger receptors, Bioinformatics, Genes.

Mecanismos y regulación de la captación por los macrófagos de lipoproteínas modificadas durante la aterogénesis

Mechanisms and regulation of the macrophage mediated uptake of modified lipoproteins during atherogenesis

Los niveles elevados de colesterol constituyen el principal factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis. Los efectos patológicos de un exceso de colesterol en sangre se ejercen en parte por la captación del mismo por los macrófagos presentes en las lesiones ateroscleróticas. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) plasmáticas se oxidan en el espacio subendotelial lesionado donde los monocitos presentes las captan a través de sus receptores scavenger. La captación de las LDL oxidadas conduce a la formación de células "espumosas", un paso crítico para el desarrollo de lesiones de ateroma. El receptor scavenger CD36 da cuenta de cerca del 50% del total de lipoproteínas captadas por los macrófagos y se expresa abundantemente en los macrófagos localizados en las estrías grasas de las lesiones de ateroma. La expresión de CD36 se regula durante la el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos, así como mediante la acción de diversas citocinas, factores de crecimiento y lipoproteínas presentes en las placas de ateroma y en las regiones donde ha tenido lugar una respuesta inflamatoria. Además, CD36 participa en el reconocimiento de células apoptóticas, una interacción que podría contribuir al desarrollo/progresión de las lesiones vasculares.

High plasma cholesterol levels are a principal risk factor for atherosclerosis. The pathologic effects of an excess of circulating cholesterol are at least in part exerted through its uptake by macrophages present within atherosclerotic lesions. Circulating low density lipoproteins (LDL) are oxidized within the injured subendothelial space where monocytes recruited in it mediate their uptake through the scavenger receptors. Oxidized LDL (OxLDL) uptake leads to the formation of foam cells, a critical step for the development of atherosclerosis lesions. Scavenger receptor CD36 accounts for near a 50% of the total macrophage uptake of modified lipoproteins, and is abundantly expressed in macrophages located in the fatty streaks and in the core region of atherosclerotic lesions. CD36 expression is highly regulated during monocyte/macrophage differentiation, and by cytokines, growth factors and modified lipoproteins present in atheroma and inflammation sites. CD36 is also known to participate in the recognition of apoptotic cells, an interaction that might also contribute to the development/progression of vascular lesions.

Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa denominados estatinas aumentan considerablemente la tasa de supervivencia de pacientes con enfermedad coronaria mediante su acción en la reducción de los niveles de colesterol plasmático y por sus efectos

It is firmly established that inhibitors of HMG-CoA reductase (statins) increase the survival rates in patients with coronary artery disease by reducing the plasma cholesterol levels and by their effects independent of their lipid-lowering actions.

The nuclear receptors peroxisome proliferator activated receptors-gamma (PPAR- γ) are highly expressed in monocytes

tos independientes de su acción hipolipemiante. Por otro lado, los receptores nucleares PPAR- γ se expresan abundantemente en los monocitos presentes en las lesiones de ateroma, donde posiblemente inhiban la activación de los monocitos. Las tiazolindinedonas, un ligando sintético de los PPAR- γ , además de incrementar la sensibilidad a insulina ejercen potentes efectos anti-aterogénicos sobre la pared arterial, por lo que se está evaluando su empleo para el tratamiento de la aterosclerosis

El eficaz uso clínico de las estatinas, así como el futuro empleo de los ligandos de PPAR- γ como fármacos anti-aterogénicos nos indujo a investigar sus efectos, tanto aisladamente como en combinación sobre la regulación de la expresión de CD36 en monocitos, así como sobre la captación por parte de estos de LDL oxidadas, un índice de su capacidad para formar células "espumosas". También hemos investigado los mecanismos moleculares que median la regulación de la expresión de CD36 por estatinas.

Nuestros resultados demuestran que las estatinas incrementan la expresión en superficie de CD36 mediante el aumento de su transcripción. Además, la combinación de estatinas y ligandos de PPAR- γ tiene un efecto aditivo sobre la expresión de CD36, aunque a través de distintos elementos reguladores presentes en el promotor del gen de CD36. Sin embargo, el incremento en la expresión de CD36 por estatinas, ligandos de PPAR- γ o su combinación no conlleva un incremento en la captación de OxLDL, lo que sugiere que estos tratamientos no aceleran la formación de células espumosas. Estos hechos, discutidos en el contexto de los distintos ligandos de CD36 y de otros receptores scavenger tienen implicaciones interesantes en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas.

También hemos investigado los mecanismos moleculares responsables de la modulación de la expresión de CD36 por estatinas. Los resultados derivados de este estudio indican que el efecto de las estatinas sobre la regulación de CD36 es independiente a su acción hipolipemiante y que tiene lugar a través de la inhibición que ejercen las estatinas sobre la prenilación de proteínas. De éstas hemos comprobado que la inactivación de la geranylgeranilación de las Rho-GTPasas por las estatinas es responsable del incremento de la expresión de CD36. Finalmente hemos comprobado que la citocalasina D, un agente que disgrega el citoesqueleto de actina, incrementa la expresión de CD36. Todos estos datos indican que las Rho GTP-asas modulan la expresión de CD36 y sugieren que las estatinas incrementan los

present in atheroma lesions, where they are thought to inhibit macrophage activation. Thiazolindinedones, a class of synthetic PPAR- γ ligands, besides improving insulin sensitivity, exert potent anti-atherogenic effects on the arterial wall, a feature that have raised the possibility of extending their use for atherosclerosis treatment.

The effective and widespread clinical use of statins, and the eventual future use of PPAR- γ ligands as anti-atherogenic drugs, prompted us to investigate their effects, both alone and in combination, on the regulation of CD36 expression in human monocytes, and on the monocytic uptake of oxidized LDL, and index of foam cell formation. We have also investigated the molecular mechanisms underlying the regulatory action of statins on CD36 expression.

Our results demonstrate that statins upregulate both CD36 surface protein and mRNA by potentiating the transcription of the CD36 gene. Furthermore, the combination of statins and PPAR-g ligands has an additive effect on CD36 expression, although through distinct promoter regulatory sites. However, upregulation of CD36 expression in monocytes by the addition of statins, PPAR- γ ligands or their combination does not lead to an enhanced OxLDL uptake, suggesting that the above treatments do not accelerate macrophage foam-cell formation. These findings, viewed in the context of the different CD36 ligands and of other scavenger receptors, have important implications on atherosclerosis development/progression.

We have also investigated the molecular mechanisms involved in the regulation of CD36 expression by statins. The results obtained indicate that the effect of statins on CD36 expression are independent of their lipid-lowering effects, and that statins exert their action by inhibiting protein prenylation. Among prenylated cell proteins we have proved that inhibition of geranylgeranylation of Rho-GTPases lead to an increase of CD36 expression. Finally, the actin cytoskeleton disrupter cytochalasin D upregulated CD36. These data indicate that Rho proteins are important modulators of CD36 expression, and strongly suggest that statins increased CD36 expression by disrupting cytoskeleton organization by inactivating Rho GTPases. These features prompt to investigate the roles of Rho GTPases and actin cytoskeleton modulators on monocytic functions affected by statins.

niveles de expresión de CD36 a través del efecto que tiene sobre el citoesqueleto de actina la inactivación de las Rho-GTPasas. Además inducen a investigar los papeles de las Rho-GTPasas y de los moduladores del citoesqueleto de actina sobre las funciones biológicas afectadas en los monocitos por las estatinas.

Línea de investigación actual

La investigación actualmente llevada a cabo se centra en el desarrollo y empleo de herramientas informáticas para facilitar el análisis de datos derivados de la secuenciación automática de genomas y de alteraciones en genes implicados en diversas patologías.

Básicamente estas herramientas incidirán sobre: a) el diseño de oligonucleótidos para la amplificación mediante PCR de los genes objeto de estudio o para el estudio de sus niveles de expresión mediante microarrays 2) la automatización de los datos derivados de los secuenciadores de DNA (análisis de calidad de los perfiles cromatográficos, ensamblaje de los fragmentos secuenciados, análisis de las secuencias obtenidas y asignación automática de mutaciones, SNPs y heteroplasmias, 3) análisis de los resultados de expresión génica derivados del empleo de microarrays de DNA, 4) creación de bases de datos relacionales que integren datos moleculares, bioquímicos y clínicos, y que faciliten la realización de estudios bioquímicos y epidemiológicos.

Actualmente estas herramientas se están implementando para la caracterización de enfermedades genéticas ocasionadas por alteraciones en el DNA mitocondrial, en el contexto de un proyecto de colaboración entre varios grupos de investigación.

Current work

Current work is focused on the development and use of bioinformatics for data analysis of automatic DNA sequencing of genomes and for the finding structural alterations in genes involved in diverse pathologies.

Basically, these tools will be directed towards the: 1) design of oligonucleotides for PCR amplification of genes and for evaluation of gene expression by microarray technology. 2) automation of data derived from DNA sequencer (base calling analysis, sequence assembly, analysis of derived sequences and automatic assignment of mutations, SNPs and heteroplasmy. 3) Analysis of microarray data, 4) creation of relational databases that integrate molecular, biochemical and clinical data, which facilitate their use for biochemical and epidemiological studies.

Actually those tools are being used, in collaboration with other research groups, for the characterization of diseases caused by alterations in the mitochondrial DNA.

Organismos financiadores/Funding Agencies

- FIS, 99/1046 (2000-2002)

Tesis Doctorales/Doctoral Thesis

- Natividad Ruiz Velasco. Regulación de la expresión del receptor scavenger CD36 por estatinas y ligandos de PPAR- γ : Papel en aterosclerosis. Contribución de las Rho GTPasas en la regulación de la expresión por estatinas. Universidad Autónoma de Madrid, 2002. Director: Dr. Miguel A. Vega Palacios.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Lobo, M.V., Huerta, L., Ruiz-Velasco, N., Teixeira, E., de la Cueva, P., Celdrán, A., Martín-Hidalgo, A., Vega, M.A., and Bragado, R. (2001) Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem.* 49, (10)1253-60.
 - Suárez, Y., Fernández, C., Ledo, B., Ferruelo, A.J., Martín, M., Vega, M.A., Gómez-Coronado, D., and Lasunción, M.A. (2002) Differential effects of ergosterol and cholesterol on Cdk1 activation and SRE-driven transcription. *Eur J Biochem.* 269, (6)1761-71.
-

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

B. Postdoctoral / Postdoctoral fellow

CARMEN ARIAS LÓPEZ

JORGE GAMONAL ARAVENA (Hasta V-2001)

LEIRE GARCÍA BENZAQUEN (Desde VI-2002)

IGNACIO DEL VALLE (Desde XI-2002)

LAURA LAU (Desde I-2002)

B. Predoctorales / Graduate Students

JUANA MARÍA LÓPEZ VERA

Personal Técnico / Technician

Palabras clave: p53, Cáncer, Apoptosis, Células madre hematopoyéticas, Transdiferenciación, Célula madre neural, Periodontitis.

Keywords: p53, Cancer, Apoptosis, Periodontitis, Haematopoietic stem cells, Neural stem cells.

Mecanismos moleculares implicados en funciones aberrantes de proteínas mutantes de p53

Molecular mechanisms underlying aberrant functions of p53 mutant proteins

La caracterización de las funciones de dos proteínas mutantes de p53, R280K y L194F, encontradas en células de adenocarcinoma mamario humanas, se realizó inicialmente en las líneas celulares tumorales de origen. Posteriormente, se transfectó transitoriamente los plásmidos que codifican las proteínas p53 mutantes y p53 salvaje en células vacías de p53, lo que permitió el análisis específico de los efectos dependientes de p53 en base a un fondo celular común. La implicación del gen supresor de tumores p53 en el cáncer está claramente establecido pues es el gen más frecuentemente mutado en la carcinogénesis. En este proceso mutaciones puntuales somáticas de p53 son el acontecimiento mutacional más frecuente y, en general, las células cancerígenas conservan la expresión de la proteína p53 mutada con pérdida del alelo salvaje. Así pues, estamos estudiando las

The functional characterisation of p53 mutant proteins R280K and L194F, found in human breast adenocarcinoma cells, was initially performed in the original tumour cells. Subsequently, transient transfection of p53 null cells with plasmids expressing both p53 mutant and wt proteins enabled the specific analysis of p53-dependent effects on the basis of a common cell background. The role of p53 tumour suppressor gene in cancer is clearly established; it is the most frequently mutated gene in malignant transformation. p53 somatic point mutations are the major mutational events, and cancer cells often retain the expression of mutant p53 protein concomitantly with the loss of the wild type allele. Thus, we are studying the functional implications of p53 mutations found in human cancer cells at two different steps of malignant transformation: the overt and initial stages. The pleiotropic response of p53 to DNA damage

implicaciones funcionales de las mutaciones de p53 encontradas en células tumorales humanas en dos etapas diferentes de la transformación maligna: tumor manifiesto y estadios iniciales de malignización. La respuesta pleiotrópica de p53 al daño en el DNA supone que mutaciones de p53 introducen alteraciones funcionales diferentes. Hemos estudiado la pérdida o ganancia de función de proteínas mutantes de p53 en relación a p53 salvaje para establecer la posible correlaciones estructura-función. Se han obtenido células transfectantes estables inducibles por un sistema regulado por tetraciclina (Tet-Off) para proteínas p53 salvaje y mutantes. Para determinar los efectos de p53 dependientes de interacciones proteicas, se empleó un mutante funcional o de contacto de p53 (R280K), transcripcionalmente inerte. Así mismo, se usó un mutante estructural de p53 (L194F), con actividad transcripcional preservada para valorar cómo alteraciones en la regulación puede inducir funciones aberrantes. Para estudiar la regulación temprana y tardía de genes, así como los perfiles de expresión en respuesta al daño en el DNA, se obtuvo RNA en diferentes condiciones experimentales. En los resultados preliminares del análisis por "microarrays" se obtuvieron paneles de genes diferencialmente regulados por las proteínas p53 mutantes en relación a p53 salvaje. Así mismo, para estudiar el papel de p53 en los mecanismos tempranos de la carcinogénesis, estamos analizando la interacción entre las proteínas p53 salvaje y mutante que ocurre en fases previas a la pérdida de heterozigosidad (LOH). Se han marcado diferencialmente las proteínas p53 salvaje y mutantes, y se ha realizado la cotransfección en células vacías de p53 para estudiar los siguientes aspectos: heteroligomerización, distribución subcelular, vida media de las proteínas y reclutamiento de proteínas en los complejos transcripcionales y de reparación. Además, se analizan las consecuencias funcionales de esta interacción en el contexto de daño en el DNA, en relación a: la parada del ciclo celular, inducción de muerte, reparación del DNA y regulación de la transcripción.

Modulación de las actividades de p53 por la securina humana

En colaboración con el laboratorio del Dr. Pintor-Toro (IRNA, CSIC) hemos estudiado la modulación funcional de p53 por la securina humana, una proteína implicada en el control de la separación de cromátidas hermanas, la cual está sobre-expresada en distintos tumores y es tumorigénica in vivo. Hemos

implies that p53 mutations may determine variable functional impairment. We have studied loss or gain of function of p53 mutant proteins versus p53 wild type in order to establish structural functional correlations. Stable inducible transfectants of p53 wild type and p53 mutant proteins have been developed in a tetracycline regulated system (Tet-Off). A contact or functional p53 mutation (R280K), transcriptionally inert, was employed to determine the involvement of protein interactions in p53 dependent effects. Similarly, a structural p53 mutation (L194F), with preserved transcriptional activity, was used to elucidate how biased gene regulation may induce aberrant functions. For comparative analysis of gene expression regulation, RNA has been obtained in different experimental conditions to study the regulation of early and late gene expression, as well as expression profiles in response to DNA damage. Preliminary results from the microarray analysis have provided a panel of genes that are differentially regulated by mutant p53 proteins versus p53 wild type. Moreover, we are also analysing the cross-talk between wild type and mutant p53 proteins that occurs previous to loss of heterozygosity (LOH), in order to gain further insight on the role of p53 in early mechanisms of carcinogenesis. p53 wt and p53 mutant proteins have been differentially tagged and cotransfected into p53 null cells to study the following issues: heteroligomerisation, subcellular distribution, protein turnover and recruitment of proteins to transcriptional and repair complexes. Moreover, the functional consequences of the interaction between wt and mutant p53 proteins in the context of DNA damage are being analysed, regarding cell cycle arrest, death induction, DNA repair and transcriptional regulation.

Modulation of p53 activities by human securin

In collaboration with the laboratory of Dr. Pintor-Toro (IRNA, CSIC) we have studied the functional modulation of p53 by human securin, a protein involved in the control of sister-chromatid separation, that is overexpressed in different tumours and is tumorigenic in vivo. We have shown that securin interacts with p53, represses its transcriptional activity and reduces its ability to induce cell death in vivo. The interaction of p53 tumour suppressor protein with securin was initially detected by phage-display screening and, the specificity of this interaction was subsequently demonstrated in vitro and in vivo. To assess the modulation of p53 transactivating ability by securin, we co-

demostrado que la securina interacciona con p53, reprime su actividad transcripcional y reduce la capacidad de inducción de muerte celular in vivo. La interacción de la proteína supresora de tumores p53 con securina fue detectada inicialmente mediante "phage-display", y la especificidad de esta interacción fue demostrada posteriormente in vitro e in vivo. Para estudiar la modulación de la capacidad transactivadora de p53 por securina, se cotransfectaron células H1299-vacías de p53 con un vector de expresión y un gen "reporter" de luciferasa (Luc) bajo el control de promotores de genes inducidos por p53, tales como BAX, 14-3-3 σ y p21. El incremento de securina, redujo significativamente la actividad transcripcional de p53 de modo dosis-dependiente. El efecto fisiológico de esta interacción se investigó en células HCT116 parentales y el "knockout" somático isogénico para securina. Se observó que la actividad transcripcional era mayor en las células securina-/- HCT116 que en las parentales. Además, la expresión de genes endógenos como 14-3-3 σ , p21 o BAX era también superior en células HCT116 securina-/-, leídos por RT-PCR cuantitativa. Analizamos también el efecto de la securina sobre la inducción de muerte celular por p53. Al transfectar células H1299 el vector de expresión pRc/CMV-p53wt se induce un 20-30% la población sub-G1 analizada por citometría de flujo. Se observó una reducción dosis-dependiente en la apoptosis inducida por p53 al co-transfectar con cantidades crecientes del vector de expresión de securina. Finalmente, usando las células HCT116 parentales y securina-deficientes, demostramos que la interacción con securina in vivo reducía la apoptosis dependiente de p53 en respuesta al daño al DNA tras tratamiento con 5-fluorouracilo. Por lo tanto, consideramos que el efecto oncogénico de la sobre-expresión de securina puede resultar de la modulación de las funciones de p53.

Estudio inmunológico y molecular de los factores que interviene en la periodontitis crónica

La periodontitis crónica se caracteriza por la inflamación de las estructuras periodontales, produciéndose la destrucción del tejido conectivo de inserción periodontal y la posterior pérdida del diente, cuyo agente etiológico es la placa bacteriana acumulada entre el diente y el tejido gingival. La activación de la respuesta inmune trae como consecuencia la secreción de citoquinas que provocan la acumulación de células de la respuesta inmune, responsables de la activación de procesos de destruc-

transfected p53-null H1299 cells with an expression vector and a luciferase reporter gene (Luc) under the control of promoters of p53-induced genes, such as BAX, 14-3-3 σ and p21. Increasing amounts of securin significantly reduced the transcriptional activity of p53 in a dose-dependent manner. The physiological effect of this interaction was investigated using HCT116 cells and somatic knockout securin-/- HCT116 cells. Higher transactivation activity was observed in securin-/- HCT116 cells than in the parental counterpart after transfection with luciferase constructs driven by the p53-dependent promoters. Moreover, quantitative RT-PCR demonstrated a higher expression of endogenous 14-3-3 σ , p21 or BAX in securin-/-HCT116 cells compared to parental cells. We next analyzed the effect of securin on the induction of cell death by p53. Transfection of H1299 cells with pRc/CMV-p53wt expression vector induced 20-30% sub-G1 population as analysed by flow cytometry. We observed a dose-dependent reduction in p53-induced apoptosis when increasing amounts of securin vector were co-transfected with p53. Finally, using parental and securin-deficient HCT116 cells, we demonstrated that interaction with securin in vivo reduced p53-dependent apoptosis in response to DNA damage inflicted by treatment with 5-fluorouracil. Thus, we consider that the oncogenic effect of increased expression of securin may result from the modulation of p53 functions.

Molecular and Immunological analysis of key factors involved in chronic periodontitis

The adult periodontal disease is characterized by the inflammation of the periodontal tissues, taking place the destruction of the connective tissue with attachment loss of the tooth, which etiologic agent is the bacterial plaque accumulated between the tooth and the gingival tissue. The activation of the immune response results in the secretion of cytokines that cause the accumulation of cells implicated in the immune response. Using techniques detecting low amounts of cytokines during the inflammatory periodontal response we will correlate the Th1/Th2 immune response with different states of disease progression. Using samples from GCF from patients with gingivitis o periodontitis we will analyze the presence of IL-12/IFN γ o IL-4/IL-6 by ELISA or CBA techniques. The determination of cytokines and cell subpopulations (Th1, Th2, B, PMN, macrophages) could help us to correlate the destructive process with a specific type of immune

ción del tejido. Usando técnicas finas de detección de citoquinas implicadas durante los procesos de activación de la respuesta inflamatoria periodontal trataremos de asociar respuesta inflamatoria Th1 o Th2 con la progresión de la enfermedad. Utilizando muestras de FGC de individuos con gingivitis y/o periodontitis analizaremos la presencia de IL-12/ IFN- γ o IL-4/ IL-6 mediante determinaciones mediante ELISA y Cytokine Binding Assay (CBA) que nos indicara respuestas del tipo Th1 o Th2. La determinación de citoquinas y de poblaciones celulares (células Th1, Th2, B, PMN, macrófagos) presentes en estas patologías nos permitirá correlacionar el proceso destructivo con tipo de respuesta inmunitaria. El estudio se complementará con el análisis del comportamiento del neutrófilo en su capacidad de destruir especies bacterianas presentes en el periodonto y que son en gran medida la primera barrera de defensa y los responsables de la liberación de los antígenos responsables de la respuesta inflamatoria. Este estudio se está llevando a cabo en colaboración con el Dr. J. Gamonal, de la U. De Chile y el Departamento de Medicina Bucofacial de la Facultad de Odontología de la U. Complutense de Madrid

Estudio experimental de la potencialidad neural de las células madre hematopoyéticas.

Las células madre se definen como células indiferenciadas con la capacidad de proliferar, auto-regenerarse y producir progenie diferenciada. Hasta hace unos pocos años se consideraba a las células madres embrionarias como el único tipo celular pluripotente, siendo de esta manera capaces de dar lugar a cualquier tipo de tejido; sin embargo distintos trabajos sugieren la posibilidad de que las células madre adultas tejido específicas, también puedan dar lugar a linajes de otros orígenes. Este fenómeno es conocido como transdiferenciación y supone un interesante objeto de estudio ya que al poder convertir un tipo de células madre en otras puede representar el substrato biológico que fundamentalmente una terapia celular para combatir diferentes enfermedades degenerativas.

En colaboración con el Dr. S. Martínez (Instituto de Neurociencias, U. Miguel Hernández de Alicante) hemos demostrado en trasplantes intracerebrales en cerebro de ratones neonatales (P0) la generación de células oligodendrogliales (O4, NG2+), neuronas (Tuj1+), astrocitos (GFAP+) y células madre neurales (nestina+) a partir de células hematopoyéticas de rato-

response. This work also will analyze the activity of the neutrophils during the progression of the periodontal disease and its capacity to destroy periopathogenic bacteria present in the periodontum which constitute the first defensive barrier against them and in great extent responsible of the secretion of antigens implicated in the inflammatory response. This study carried out in collaboration with Dr. J. Gamonal U. Chile and the Department of Medicine and Bucofacial Surgery, Section of Periodoncia of the Faculty of Odontology, University Complutensis of Madrid (UCM)

Hematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into neural stem cells

Stem cells are self-renewal, pluripotent cells that in adult life proliferate by characteristic asymmetric divisions, in which one daughter is committed to differentiation and the other remains as a stem cell. Until now, only embryonic stem cells have been considered as responsible regenerate all kind of cellular tissues; however, a set of different works has recently establish the possibility that tissue specific stem cells could generate other cellular types from different tissue. This event has been called trans-differentiation, which has been deeply analyzed because the possibility to used adult stem cells of one tissue to generate cells from another tissue, and therefore used a cellular therapy to treat degenerative diseases. In collaboration with Dr. S. Martínez (Neuroscience Institute, Miguel Hernandez U., Alicante) we have shown the potentiality of hematopoietic bone marrow cells to transdifferentiate as neural stem cells as well as into oligodendrocytes (O4, NG2), neurons (Tuj1) and astrocytes (GFAP) from adult hematopoietic progenitor cells (CD117+) in vivo, after intracerebral transplantation in the neonatal mouse brain. The aim of this project is to generate, from CD117/Scal magnetic beads purified bone marrow cells, "in vitro" transdifferentiation into neural precursors. Neural stem cells will be maintained as neurospheres in the presence of EGF and FGFb, which when removed from the conditional media will generate neural cells from different lineages. Using these cells we will analyzed the gene profile under different transdifferentiation conditions and the functionality of the genes selected further investigated by knock-down interference RNA assays

nes adultos enriquecidas en células progenitoras CD117. El objetivo de nuestro trabajo es, trabajando en un modelo de ratón, generar la transdiferenciación de células madre hematopoyéticas a células madre neurales, responsables de la generación de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, en un sistema "in vitro". Seleccionaremos células madre hematopoyéticas CD117+(c-kit) de ratones adultos mediante bolas magnéticas, que se cultivaran en medios específicos para el crecimiento de las células madre neurales. Las células madre neurales se mantienen indiferenciadas en cultivo gracias a factores de crecimiento como el EGF y el FGF₂ en forma de neuroesferas (grupos de células clonales) y en ausencia de estos factores son capaces de diferenciarse a las distintas células nerviosas. Analizaremos los cambios de expresión génica de las células en proceso de transdiferenciación se purificará, a distintos tiempos, tras hibridación cRNA con microarrays de DNA. La funcionalidad de los genes seleccionados serán posteriormente investigada mediante técnicas de knock-down con siRNA.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- PN I+D, SAF00-118-C03 (2000-2003)
- FIS, (2001- 2003)
- Neuropharma SA. (2002-2004)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Ana Gutiérrez del Arroyo Valenciano. Aspectos funcionales de la proteína p53 en la regulación de la apoptosis inducida por agentes genotóxicos. Universidad Autónoma de Madrid, 2000. Director: Dr. Augusto Silva.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Casanova, B., De la Fuente, M.T., García-Gila, M., Sanz, L., Silva, A., García-Marco, J., and García-Pardo, A. (2001) The class II tumor-suppressor gene RARRES3 is expressed in B-cell lymphocytic leukemias and down regulated with disease progression. *Leukemia*. 15, 1521-26.

- Fresno-Vara, J.A., Domínguez, A., Silva, A., and Martín-Pérez, J. (2001) The SFK is required for prolactin induction of pro-B lymphocytes proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2171-2177.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Blanco, E., and Silva, A. (2001) Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy and immunohistochemistry. *J. Periodontol.* 72, 517-521.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Jorge, O., and Silva, A. (2001) Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and Interleukin-8 and Rantes chemokines in adult periodontitis. *J. Periodontol.* 35, 1-10.
- Bernal, J., Luna, R., Espina, A., Ramos, F., Romero, F., Arias, C., Lazaro, I., Silva, A., Tortolero, M., and Pintor-Toro, J.M. (2002) Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nature Genetics* 32, 306-11.
- Bonilla, S., Alarcón, P., Villaverde, R., Aparicio, P., Silva, A., Martínez, S. (2002) Haematopoietic stem cells from adult bone marrow differentiate into oligodendrocyte precursors in neonatal brain. *Eur. J. Neuroscience.* 15, 1-10.
- De la Fuente, M.T. Casanova, B., García Gila, M., García Marco, J., Silva, A., and García Pardo, A. (2002) Engagement of $\alpha 4\beta 1$ integrin (CD49d/CD29) by its ligand fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. Role of Bcl-Xl, Bax and p53. *J. Leuko. Biol* 71, 495-502.
- Puig-Kröger, A., Relloso, M., Fernández-Capetillo, O., Zubiaga, A., Silva, A., Bernabéu C., and Corbí, A. (2002) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERK) and p38 Mitogen activated Protein kinases (p38MAPK) differentially affect the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98, 2175-82.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Briz, O., Macías, R.I.R., Vallejo, M., Silva, A., Serrano, M.A., Marin, J.J.G. (2003) Usefulness of free and liposome-encapsulated cytostatic bile acid derivatives to circumvent resistance to chemotherapy of enterohepatic tumors. *Molecular Pharmacology*. (en prensa/in press).
 - Gamonal, J., Sanz, M., O'Connor, A., Acevedo, A., Suárez, I., Sanz, A., Martínez, B., and Silva, A. (2003) Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J. Clinical. Periodontol.* (en prensa/in press).
-

Mecanismos Celulares de Acción de Taxoides

Cellular Mechanisms of Taxoid Action

ISABEL BARASOAIN BLASCO
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigadora de Carrera / Staff Scientist

Palabras clave: Taxol, Microtúbulos, Centrosomas, Células tumorales

Keywords: Taxol, Microtubules, Centrosomes, Tumour cells

Implicación del centrosoma en la citotoxicidad inducida por Taxol

Centrosome implication in Taxol-induced toxicity

Utilizando un derivado fluorescente activo de paclitaxol hemos observado que la diana primaria de la citotoxicidad inducida por paclitaxol son el centrosoma además de los microtúbulos de los polos del huso.

By using active fluorescent derivatives of paclitaxel we characterized the centrosome, in addition to spindle pole microtubules as the main primary target for paclitaxel induced toxicity.

We were able to discriminate between two mechanisms of Taxol-induced cell death, in a centrosome related manner.

El centrosoma, además de nuclear y organizar el citoesqueleto de microtubulos, esta implicado en la entrada y salida de mitosis. Hemos podido discriminar dos mecanismos de muerte celular tumoral inducida por Taxol en relación con el centrosoma.

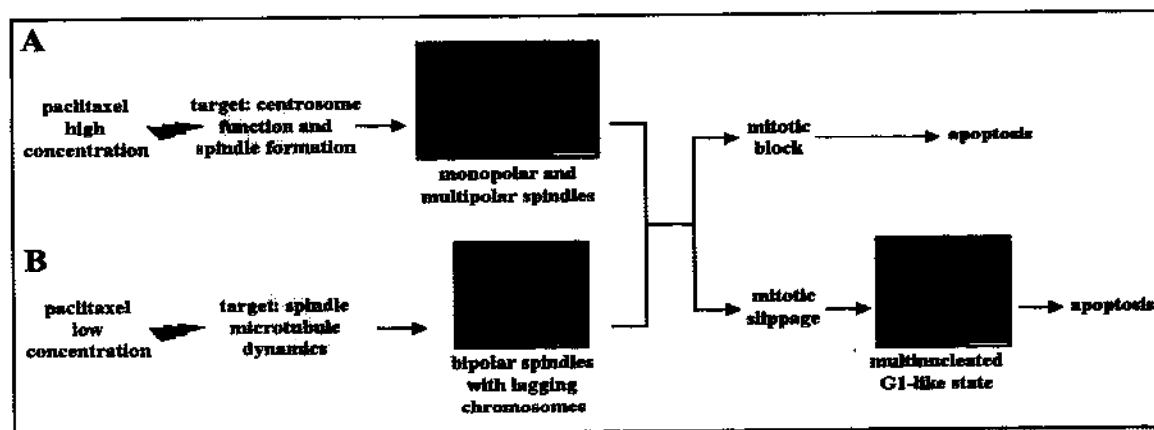


Figura: Mecanismos de acción de taxoides dependientes del ciclo celular

Figure: Cell-cycle dependent mechanisms of action of taxanes. Bars: 10 μm , (from Abal et al. Current Cancer Drug Targets, 2003, in press).

Células del carcinoma de ovario OVCAR-3 tratadas con concentraciones citotóxicas de taxoide se acumulan transitoriamente en G2 y mitosis; una parte desarrolla apoptosis desde mitosis mientras que otra fracción progresa a un estado G1 multinucleado con doble contenido de DNA, y que después desarrollara apoptosis. Esta ultima población desaparece cuando las células se sincronizan y se tratan en fase G1 o en fase S temprana. La afectación de la función correcta del centrosoma durante la formación del huso conduce a mitosis monopolares y multipolares, y la imposibilidad de continuar las funciones normales del huso da lugar a una activación permanente del punto de control mitótico y la inducción de apoptosis. Alternativamente, si las células se tratan con Taxol una vez que el centrosoma ha logrado dirigir la formación del huso bipolar, la droga actua principalmente a nivel de la dinámica de los microtúbulos del huso y la segregación cromosómica, produciéndose un bloqueo transitorio en mitosis y dando lugar a una célula multinucleada que termina en apoptosis.

Mecanismos celulares de acción de biomiméticos de Taxol

El sitio de unión de Taxol en los microtubulos es una diana farmacológica cuya función es todavía desconocida. Diversas sustancias naturales químicamente diferentes mimetizan los efectos citotóxicos de Taxol, aparentemente uniéndose al mismo sitio ubicuo de unión de Taxol en los microtúbulos. Entre estas se encuentran las epotilonas (de myxobacterias), la discodermolida (de esponjas marinas) y eleuterobina (de un coral marino). Cabe preguntarse si estas sustancias son moléculas toxicas defensivas generadas por evolución convergente o si hay un papel biológico mas fundamental del sitio de unión de Taxol, es decir si este podría reconocer reguladores celulares endogenos que son mimetizados por Taxol. Bacatina III, un precursor en la producción de Taxol carente de la cadena lateral en C-13 provoca la mayor parte de la afinidad del Taxol y sus efectos celulares, que son debidos a la interacción del núcleo 2-O-benzoil-taxano con el sitio de unión de los microtubulos, mientras que la cadena lateral en C-13 provee solo un anclaje adicional. Baccatina III induce manojos de microtúbulos y husos multipolares en células PtK2 y en U937, asi como bloqueo mitótico y apoptosis de células U937, a concentraciones de 200-500 veces mayores que Taxol, mientras que la cadena lateral en C-13 es inactiva en estos ensayos. Empleamos estos ensayos celulares para caracterizar

Ovarian carcinoma OVCAR-3 cells treated with cytotoxic taxoid concentrations transiently accumulated in G2 and mitosis, part of them developed apoptosis from mitosis, whereas the other fraction progressed into a multinucleated G1-like state with double DNA content, and then developed apoptosis. This latter population disappeared when cells were synchronized and treated at G1 or early S phases. These results indicate that impairment of the correct centrosome function on mitotic spindle formation leads to abnormal monopolar and multipolar spindles. By contrast, in cells treated with Taxol once the centrosome has been able to help organize a bipolar spindle, the drug acts mainly at the level of spindle microtubules and chromosome segregation. The impossibility to resume normal spindle functions results in activation of the mitotic checkpoint and triggering of apoptosis; alternatively a transient block and mitotic slippage with progression to a multinucleated G1-like stage lead to apoptosis.

Cellular mechanisms of action of Taxol biomimetics

The Taxol binding site of microtubules is a pharmacological target with an unknown cellular function. A number of diverse natural substances, including epothilones (from myxobacterias), discodermolide (from marine sponges), and eleutherobine (from a marine soft coral), mimic the cytotoxic effects of Taxol, apparently by binding to the ubiquitous microtubule site. Despite the different chemical structures of these compounds they appear to share a common pharmacophore with Taxol. It may be asked if these are defensive toxic molecules generated by convergent evolution, or whether there is a more fundamental biological role of Taxol binding site of microtubules, and if this site might recognize endogenous cellular regulators that are mimicked by Taxol. Baccatin III, a precursor of Taxol without the C-13 side chain, which is capable of displacing taxol from its microtubule binding site, induces microtubule bundles and multipolar spindles in PtK2 and U937 cells, as well as mitotic blockade and apoptosis in U937 cells at concentrations 200-500 times that of Taxol. The lateral chain C13 is inactive in these assays. Analysis of baccatin and Taxol bindings suggest that most of the affinity of Taxol is contributed by the interaction of the 2-O-benzoyl-taxane ring system with the microtubule binding site, whereas the C-13 side chain provides only a specific additional anchor. The cellular assays are being employed to characterize possible

posibles nuevos miméticos de Taxol con actividad antitumoral procedentes del cribaje de extractos marinos. *new Taxol mimetic compounds with antitumour activity from a screen of marine extracts.*

Organismos Financiadores/Funding Agencies

— MCyT, BIO2001-1725 (2002-2004)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Abal, M., Souto, A.A., Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2001) Centrosome and spindle pole microtubules are main targets of a fluorescent taxoid inducing cell death. *Cell Motil. Cytoskel.* 49, 1-15.
- Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2001) The interaction of Baccatin III with the Taxol binding site of microtubules determined by a homogenous assay with fluorescent taxoid. *Biochemistry* 40, 11975-11984.
- Arregui, L., Muñoz-Fontela, C., Serrano, S., Barasoain, I., and Guinea, A. (2002). Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliated protozoa with a fluorescent taxoid. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49, 312-318.
- Diaz, J.F., Barasoain, I., and Andreu, J.M. (2002). Fast Kinetics binding to microtubules. Effects of solution variables and microtubule associated proteins. *J. Biol. Chem.*, electronically published Dec 2002, DOI 10.1074 / jbc.M211163200)

Proximo artículo/Forthcoming article

- Abal, M., Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2003). Taxanes: Microtubule and centrosome targets and cell cycle dependent mechanism of action. *Current Cancer Drug targets* (in press)

Patente/Patent

- Andreu, J.M., Diaz, J.F., and Barasoain, I. (2001). Método de detección y evaluación de compuestos miméticos de paclitaxel. Solicitud 200101710; PCT/ES02/00262.
-

Patología Molecular / Genética del Complemento *Molecular Pathology / Complement Genetics Laboratory*

SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

PILAR SÁNCHEZ-CORRAL (Hasta II-2002)
Investigadora Contratada / Research Associate

OLGA CRIADO GARCÍA
KAREN ELISE HEATH (Desde X-2001)
M^a ESTHER GALLARDO PÉREZ (Desde VIII-2001)
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

JORGE ESPARZA GORDILLO
M^a ELENA FERNÁNDEZ SÁNCHEZ
M^a ESTHER GALLARDO PÉREZ (Hasta VII-2001)
BELEN GARCÍA FOJEDA GARCÍA VALDECASAS (Desde IX-2002)
ELENA GOICOECHEA DE JORGE (Desde VI-2001)
OLATZ HUARTE PANIEGO (Desde IX-2001)
DAVID PÉREZ CABALLERO (Hasta X-2002)
B. Predoctorales / Graduate Students

SUSANA INFANTES ESTEBAN
IRIA MEDRAÑO FERNÁNDEZ (Desde IX-2002)
M^a SOLEDAD VARA DE REY
Personal Técnico / Technician



Palabras clave: Complemento, Alcaptonuria, Síndrome hemolítico urémico, Epilepsia de Lafora, DNA mitocondrial

Proteínas reguladoras de la activación del complemento; el cluster RCA en 1q32.

El complemento es el mecanismo efector humoral más importante de la defensa natural o inespecífica, y está diseñado para defendernos de la infección generando componentes activos capaces de lisar los microorganismos o de revelar su presencia al sistema inmune celular. Su correcto funcionamiento requiere de reguladores de su actividad y de receptores para sus componentes activos en células del sistema inmune. La mayoría

Keywords: Complement, Hemolytic uremic syndrome, Alkaptonuria, Epilepsy of the Lafora type, Mitochondrial DNA

Complement regulatory proteins. The RCA gene cluster in 1q32

Complement is a major defense 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

de estos componentes reguladores y receptores pertenece a la misma familia de proteínas. En 1985/6 describimos que sus genes están estrechamente ligados en un agrupamiento genético localizado en el brazo largo del cromosoma 1 humano (1q32) que denominamos sistema RCA. Nuestro laboratorio mantiene desde entonces una línea de investigación centrada en el estudio funcional y genético de proteínas reguladoras del sistema del complemento. Los aspectos de la biología del sistema RCA que hemos abordado incluyen: i) Cartografía genética, incluyendo el clonaje y la secuenciación del sistema RCA humano y la caracterización de nuevos genes en esta región cromosómica; ii) Estudios comparativos y análisis de la evolución molecular del sistema RCA; iii) Caracterización de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de algunos de los genes del sistema RCA; iv) Interacción de proteínas reguladoras del complemento con patógenos microbianos. Durante estos últimos años el análisis estructural y funcional de las proteínas reguladoras del complemento ha tomado un renovado protagonismo pues es incuestionable la importancia de estas proteínas en la susceptibilidad a infecciones o en determinadas enfermedades crónicas que resultan en daños importantes a tejidos u órganos. En este sentido, la actividad del laboratorio en esta línea se centra en el estudio del papel de factor H en síndrome hemolítico urémico atípico y de C4BP en trombosis.

Bases moleculares de la alcaptonuria

Alcaptonuria (AKU; McKusick número 203500), el ejemplo clásico de error metabólico congénito, es una enfermedad poco frecuente en la que el ácido homogentísico, un intermediario de la ruta catabólica de la fenilalanina no puede metabolizarse causando homogentísico aciduria (orina negra), ocronosis (pigmentación del tejido conjuntivo) y artrosis. Los pacientes AKU son deficientes de homogentísico dioxigenasa (HGO, EC 1.13.11.5), la enzima que cataliza la conversión de homogentísato a maleilacetoacetato. Utilizando un modelo fúngico para alcaptonuria desarrollado por el Dr. M. A Peñalva (CIB/CSIC) y aprovechando los enormes recursos generados por el Proyecto Genoma Humano, en 1996 clonamos el gen HGO humano y demostramos que los pacientes AKU son homocigotos o heterocigotos compuestos para mutaciones pérdida de función en HGO. En los años sucesivos hemos completado la caracterización de las bases moleculares, estructurales y la epidemiología genética de esta enfermedad. Más datos sobre esta línea de inves-

belong to the same family of proteins and are coded by closely-linked genes within the RCA gene cluster, located on the long arm of chromosome 1 (1q32). Since we described the RCA gene cluster in 1985/6, research in our laboratory has been focused on the study of the genetics and function of the proteins that regulate the complement system. Aspects of RCA biology studied in our laboratory include: i) Genetic mapping of the RCA gene linkage group. This includes cloning, sequencing and characterization of new genes within the RCA; ii) Comparative studies and molecular evolution of the RCA linkage group; iii) Characterization of the molecular mechanisms that regulate the expression of some of the RCA genes; iv) Interaction of RCA proteins with microbial pathogens. During these last years the structural and functional analysis of the complement regulatory proteins has gained renewed interest because of the important role that complement regulatory proteins play in susceptibility to infections and in many chronic diseases that result in important damage to tissues or organs. In this regard, we focus on the study of the roles of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome and of C4BP in fibrosis and thrombosis.

Molecular basis of alkaptonuria

Alkaptonuria (AKU; McKusick number 203500), the prototypic inborn error of metabolism, is a rare disease in which homogentisate, an intermediary product in the phenylalanine catabolic pathway, cannot be further metabolized and causes homogentisic aciduria, ochronosis and arthritis. AKU patients are deficient for homogentisate dioxygenase (HGO, EC 1.13.11.5), the enzyme mediating the conversion of homogentisate to maleylacetoacetate. In 1996, using a fungal model for alkaptonuria developed by Dr. M. A Peñalva (CIB/CSIC) and taking advantage of the great resources made available by the Human Genome Project, we cloned the human HGO gene and demonstrated that AKU patients are homozygous, or compound heterozygous, for loss-of-function mutations in HGO. During these years we have completed the characterization of the molecular, structural and epidemiological bases of the disease. More information about this line of research is available at <http://www.cib.csic.es/akudatabase/index.htm>.

tigación en la dirección de Internet: <http://www.cib.csic.es/akudatabase/index.html>.

Bases moleculares de la epilepsia mioclónica progresiva de Lafora

La enfermedad de Lafora (LD, EPM2; MIM 254780) es la causa más frecuente de epilepsia mioclónica progresiva en los países del sur de Europa. La mayoría de los enfermos fallecen antes de 10 años después del comienzo de la enfermedad tras evolucionar a un estado vegetativo terminal. La LD se caracteriza por la presencia sistémica de depósitos intracelulares de una sustancia intensamente PAS positiva (llamados cuerpos de Lafora) de composición similar al glucógeno o la amilopectina. LD se hereda como un carácter autosómico recesivo. El gen responsable de la LD (EPM2A) se localiza en 6q24. En 1999, en colaboración con el Dr. J.M. Serratosa (FJD), identificamos el gen responsable de LD y demostramos que codifica una proteína con homología con proteínas tirosin-fosfatasa duales (PTPasas) que denominamos laforina. En esta línea de investigación pretendemos la caracterización funcional de la proteína laforina y establecer por qué su ausencia determina la enfermedad de Lafora. Con este fin, estamos desarrollando una estrategia múltiple con aproximaciones genéticas, bioquímicas y de biología molecular y celular. Parte central en este proyecto es la utilización de técnicas genómicas y proteómicas. Esperamos que los resultados de este proyecto aporten datos sobre los procesos moleculares causantes de la patología y que este conocimiento permita delinear abordajes terapéuticos.

Secuenciación DNA mitocondrial

El DNA mitocondrial (mtDNA), el segundo sistema genético de las células eucariotas, tiene un papel fundamental en la fisiología celular y esta frecuentemente implicado en el desarrollo de procesos patológicos. Su tamaño reducido (16.569 bp) hace que el genoma mitocondrial sea susceptible de ser analizado completamente de cara a identificar variaciones en su secuencia que determinen alteraciones funcionales. Sin embargo, en la actualidad no existen estrategias que permitan la secuenciación completa del mtDNA de forma automática con un coste razonable. Este proyecto tiene como objetivo el desarrollo de un procedimiento rápido, sencillo y económico para secuenciar y anotar automáticamente el mtDNA.

Molecular basis of the progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type

The Lafora disease (LD, EPM2; MIM 254780) is the most frequent cause of progressive myoclonus epilepsy in Southern Europe. Most patients die within 10 years from the onset, following a rapid progression to a vegetative terminal state. LD is characterized by the presence of polyglucosan intracellular inclusion bodies (so-called Lafora bodies) showing a composition that resembles that of glycogen or amylopectin. LD is inherited as an autosomal recessive trait. The LD gene (EPM2A) is located in 6q24. In 1999, in collaboration with Dr. J.M. Serratosa (FJD) we identified the gene responsible for LD and demonstrated that it codes for a protein with homology to dual protein tyrosine phosphatases (PTPases) that we denominated laforin. In this line of research we will functionally characterize laforin and determine why its absence causes Lafora disease. To this end we are developing a multidisciplinary strategy, including genetic, biochemical and molecular and cellular biology approaches. Central to this approach is the use of genomic and proteomic approaches. We expect that our results will increase our understanding of the molecular processes underlying the pathology and that this knowledge will allow us to delineate therapeutic approaches.

Sequencing of mitochondrial DNA

The mitochondrial DNA (mtDNA), the second genetic system of the eukaryotic cell, plays an important role in the cellular physiology and is frequently involved in the development of pathologic processes. Its small size (16.569 bp) makes the mitochondrial genome susceptible of being completely analyzed in order to identify sequence variations that result in functional anomalies. However, nowadays there are no strategies to sequence completely the mtDNA at low cost. Our goal is to develop a simple fast and affordable protocol to sequence completely and annotate automatically the mtDNA on a routine basis.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- UE/CICYT, FEDER 2FD97-1292. (1999-2001)
- CAM, 08.6/0028.1/2000. (2001-2002)
- CICYT, SAF-99/0013-C02-01. (1999-2001)
- MCyT, SAF2001-0613 (2001-2004)
- Fundación Ramón Areces (2003-2005)
- MCyT, SAF2002-1083 (2003-2005)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- María Esther Gallardo Pérez. Genes Humanos de la Familia SIX/SINE OCULIS: Genética molecular e implicaciones en malformaciones congénitas. Universidad Complutense de Madrid, 2001. Director: Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba.
- David Pérez Caballero. Proteínas reguladoras de Complemento y enfermedad. Infecciones Piogénicas y Síndrome Hemolítico Urémico. Universidad Autónoma de Madrid, 2001. Director: Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba.
- Daniel Beltrán Valero de Bernabé. Bases Moleculares de la Alcaptonuria. Universidad Autónoma de Madrid, 2002. Director: Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Gallardo, M.E, Desviat, L.R., Rodríguez, J.M., Esparza, J., Pérez-Cerdá, C., Pérez, B., Rodríguez-Pombo, P., Navarrete, R., Sanz Criado O, R. Ribes, A., Gibson, M., Rodríguez de Córdoba, S., Ugarte, M., and Peñalva M.A. (2001) The molecular basis of 3-methylcrotonylglycinuria, a disorder of the leucine catabolism. *Am. J. Human Genet.* 68, 334-346.
- Pérez-Caballero, D., González Rubio, C., Gallardo, M.E, Vera, M., López-Trascasa, M., Rodríguez de Córdoba, S., and Sánchez-Corral, P. (2001) Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am. J. Human Genet.* 68, 478-484
- Rodríguez de Córdoba, S., Gallardo, M.E., López-Ríos, J., and Bovolenta, P. (2001) The human SIX family of homeobox genes. *Current Genomics* 2(3), 231-242.
- Goicoechea de Jorge, E., Lorda, I., Gallardo, E., Pérez, B., de Ferrán, C.P., Mendoza, H., and Rodríguez de Córdoba, S. (2002) Alcaptonuria in the Dominican Republic. Identification of the founder AKU mutation and further evidence of mutation hot spots in the HGO gene. *Journal of Medical Genetics* 39, e40.
- Lorda-Sánchez, I, Sanz, R., Díaz-Guillén, M.A., Fernández-Toral, J., Heine Suñer, D., Rodríguez de Alba, M., González-González, C., Trujillo, M.J., Ramos, C., Rodríguez de Córdoba, S., and Ayuso, C. (2002) Aniridia as part of a WARG syndrome in a girl whose brother presented hypospadias. *Genet. Counsel.*13(2),171-7.

- Marcos I, Borrego, S., Rodríguez de Córdoba, S., Galán, J.J., and Antiñolo, G. (2002) Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SMAP1 gene. *Gene* 292, 167-71.
- Sánchez-Corral, P., Pérez-Caballero, D., Huarte, O., Simckes, A.M., Goicoechea de Jorge, E., López-Trascasa M., and Rodríguez de Córdoba, S. (2002) Structural and functional characterization of factor H mutations associated with atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am. J. Human Genet.* 71, 1285-1295.

Contribuciones a Libros / Contributions to Books

- Sánchez-Corral, P., and Rodríguez de Córdoba, S. (2002) C4b-binding protein. In *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*. (Ed: John Wiley and Sons, Inc) pp: 509-512.
-

Virología Molecular de Vaccinia

Molecular Virology of Vaccinia

EDUARDO PAEZ ABRIL

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

MARÍA LUISA GÓMEZ UREÑA (Hasta VII-2001)

JOSÉ IGNACIO QUETGLAS MAS (Desde IX-2001)

B. Predoctorales / Graduate Students

FRANCISCO GARCÍA TABARES

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 Orthopoxvirus y es bien conocido por su utilización como vacuna viva en la única campaña de vacunación que ha conseguido la erradicación de una enfermedad viral, como es el caso de la viruela. El virus vaccinia u otros virus relacionados pueden ser utilizados en el futuro como vacuna viva contra otros patógenos de importancia médica y veterinaria. Este proyecto pretende identificar y caracterizar proteínas de membrana de virus vaccinia implicadas en el fenómeno de fusión celular y diseminación víricas con el fin de definir los mecanismos de infectividad y patogénesis de este virus humano y de obtener mejores vectores basados en el virus vaccinia que pudieran tener un uso más seguro en el laboratorio y una aplicación en el desarrollo futuro de nuevas vacunas recombinantes. Este proyecto permitiría acometer el objetivo propuesto recientemente por la OMS de crear una nueva vacuna de la viruela más segura. Utilizando virus vaccinia recombinantes obtenidos 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

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. The task recently put by WHO to create a novel safer smallpox vaccine can be accounted with projects like this. Vaccinia virus recombinants obtained 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



Figura: Virus de la vacuna de la viruela en los momentos previos a la entrada en la célula vistos al microscopio electrónico. El virus de la viruela de morfología similar podría ser reutilizado como arma de destrucción masiva. La primera y única vez que se ha utilizado como arma biológica fue en el siglo XVIII cuando los colonos de Norteamérica lo utilizaron deliberadamente para derrotar a los indios indígenas.

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.

genes. Finally, the efficacy of these attenuated virus recombinants when compared with the wild-type virus will be tested.

We have also obtained recombinant viruses expressing heterologous proteins which are most likely involved in autoimmune and tumoral disease development. We have analyzed in vivo the immune response and its therapeutic ability. These recombinant viruses may be considered as valuable tools toward deciphering the molecular mechanism of the immune response and they provided new avenues of therapeutic intervention in these important diseases.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PM97-0142 (1998-2001)
- DGI, CM, 08.2/0032.1/1999 (1999-2001)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Páez, E. (2001) El virus vaccinia produce un receptor soluble de interferón (IFN) alfa/beta que se une a la superficie celular y protege a las células del efecto antiviral del IFN. *Virología* 8, 73-74.
-

Departamento de Microbiología Molecular

Department of Molecular Microbiology

Jefe de Departamento
Department Head

RUBENS LÓPEZ GARCÍA

Profesoras de Investigación

ERNESTO GARCÍA LÓPEZ
JOSE LUIS GARCÍA LÓPEZ
RUBENS LÓPEZ GARCÍA
MIGUEL ÁNGEL PEÑALVA SOTO

Investigadores Científicos

RAMÓN DÍAZ OREJAS
PEDRO GARCÍA GONZÁLEZ
CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA
JOSE ANTONIO LEAL OJEADA
ÁNGEL T. MARTÍNEZ FERRER

Científicos Titulares

EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ
M^º ELENA FERNÁNDEZ-TRESGUERRES
RAFAEL GIRALDO SUÁREZ
ALDO GONZÁLEZ BECERRA
M^º DEL CARMEN GUTIÉRREZ RUEDA
(Hasta VI-2001)
MARÍA JESUS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ
MARÍA TERESA SUÁREZ GONZÁLEZ

Titulados Superiores de OPI

SARA ISABEL PEREZ PRIETO
SILVIA RODRÍGUEZ SAINT-JEAN

Personal Técnico

ELOISA CANO CONGOSTO
MANUEL CARRASCO FERNÁNDEZ
LUIS MANUEL GUATA BENEIT
JESUS LÓPEZ RAMÍREZ
ROSA MARTÍNEZ DALMAU
FRANCISCA PILAR MORANTE GONZÁLEZ
CONSUELO PARDO ABARRIO
TERESA RAPOSO TRIANO (Hasta XII-2001)
ELENA REYO HERNÁNDEZ
M^º MERCEDES SÁNCHEZ CARMONA
ANA M^º SERRANO LÓPEZ
MARÍA JOSE TOBAJAS MARTÍN
(Desde XI-2001)

Secretaria

CARMEN PARTEARROYO LACABA

Biodegradación de la Lignina

Lignin Biodegradation

ÁNGEL T. MARTÍNEZ FERRER
Jefe de Grupo / Group Leader
M^ªJESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

FRANCISCO GUILLÉN CARRETERO
SUSANA CAMARERO FERNÁNDEZ
JAVIER RUIZ DUEÑAS
Investigadores Contratados / Research Associates

OSCAR MARIANO NUERO GARCÍA (Hasta VIII-2002)
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

OLGA CALERO RUEDA
PATRICIA FERREIRA NEILA
VÍCTOR GÓMEZ TORIBIO (Hasta III-2002)
DAVID IBARRA TREJO
VÍCTOR LEANDRO PANINUTTI (Hasta IV-2001)
MARTA PÉREZ BOADA
ENRIQUE RODRÍGUEZ SÁNCHEZ
MARIELA SPERANZA
ISABEL VALLÉS ALBERDI (Desde I-2002)
ELVIRA ROMERO GUZMÁN (Desde XII-2002)
B. Predoctorales / Graduate Students

TERESA RAPOSO TRIANO (Hasta XII-2001)
MARIA JOSÉ TOBAJAS MARTÍN (Desde XI-2001)
Personal Técnico / Technicians



Palabras clave: Lignina, Peroxidasas, Lacasas, Biotecnología, Biodegradación

Metaloenzimas de hongos que oxidan compuestos aromáticos de interés industrial o medioambiental

A fin de saber como los basidiomicetos ligninolíticos son capaces de degradar compuestos aromáticos recalcitrantes y aprovechar esta información para diseñar nuevos bioprocesos,

Keywords: Lignin, Peroxidases, Laccases, Biotechnology, Biodegradation

Fungal metalloenzymes oxidizing aromatic compounds of industrial

In order to understand how ligninolytic basidiomycetes manage to degrade recalcitrant aromatic compounds and to take advantage of this to design new bio-processes the following

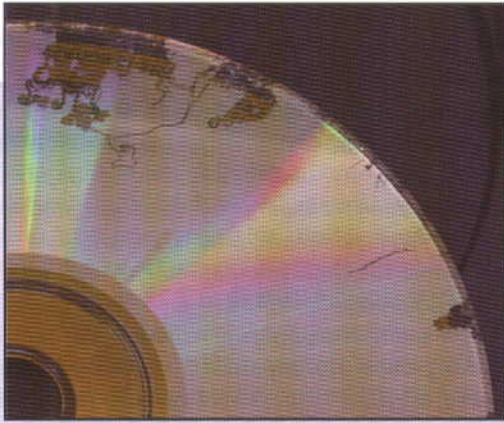


Figura: Alteración microbiana de un disco compacto: La colonización interna del CD por un hongo puede destruir parcialmente la capa de metal perdiéndose la información grabada

Figure: Microbial alteration of a compact disk: The metal layer can be partially destroyed during internal colonization of the CD by a fungus and the information was lost

se definieron los siguientes objetivos: i) Optimizar sistemas de expresión para peroxidases y lacasas de hongos (para ser utilizados en ingeniería de proteínas y fermentaciones industriales) comparando el repliegado de la proteína recuperada a partir de cuerpos bacterianos de inclusión, la expresión mejorada en ascomicetos industriales y el desarrollo de un sistema de expresión en basidiomicetos; ii) caracterizar en términos de relaciones estructura-función algunas de las metaloenzimas más relevantes producidas por los basidiomicetos y, basándose en esta información, mejorar las propiedades catalíticas de algunas de ellas para su aplicación industrial utilizando técnicas de ingeniería de proteínas; iii) desarrollar procesos eficaces de fermentación para la producción de las metaloenzimas más prometedoras usando los sistemas de expresión desarrollados, y evaluar su aplicación industrial en la producción de alimentos, fabricación de papel (como alternativa a procesos contaminantes) y/o otras aplicaciones respetuosas con el medio ambiente.

El plan de trabajo incluye las siguientes tareas: i) clonación de peroxidases y lacasas (para optimización de la expresión, mutagénesis dirigida y fermentación con enzimas recombinantes); ii) Expresión en *Escherichia coli* y producción de enzima activa (replegado de proteína a partir de los cuerpos de inclusión); iii) expresión de metaloenzimas fúngicas en ascomicetos (utilizando *Emericella nidulans* como referencia y *Aspergillus oryzae* para la expresión industrial); iv) Expresión de metaloenzimas en basidiomicetos usando *Schizophyllum commune* como modelo, con objeto de desarrollar un nuevo modelo de expresión

objectives are defined: i) To optimize expression systems for fungal peroxidases and laccases (to be used for protein engineering and industrial fermentation) by comparing refolding of protein from bacterial inclusion bodies, improved expression in industrial ascomycetes, and development of a basidiomycete expression system; ii) to characterize in terms of structure-function relationships some of the most relevant metalloenzymes produced by basidiomycetes and, based on the above information, to improve the catalytic properties of some of them for industrial application by protein engineering techniques; and iii) to develop efficient fermentation processes for the production of the most promising metalloenzymes using the expression tools developed, and to evaluate their industrial applicability in food production, paper pulp manufacture (as alternative to contaminating processes) and/or other environmentally-sound applications.

*The workplan includes the following workpackages: i) Cloning DNA encoding peroxidases and laccases (for optimization of expression, site-directed mutagenesis, and recombinant enzyme fermentation); ii) Expression in *Escherichia coli* and production of active enzyme (refolding of protein from inclusion bodies); iii) Fungal metalloenzyme expression in *Ascomycetes* (using *Emericella nidulans* as a reference and *Aspergillus oryzae* as a fungal host for industrial expression); iv) Metalloenzyme expression in *Basidiomycetes* (using *Schizophyllum commune* as a model to develop a new expression system in the industrial basidiomycete *Pycnoporus cinnab**

en el basidiomiceto industrial *Pycnoporus cinnabarinus* v) Aislamiento y caracterización de enzimas relevantes (incluyendo una nueva peroxidasa); vi) Análisis de espectroscopía de NMR y difracción de rayos x (para obtener modelos moleculares e información estructural sobre las enzimas nuevas y recombinantes); vii) Estudios estructurales y modificación de proteínas (utilizando los sistemas de expresión mas adecuados) y ix) evaluación de la aplicabilidad industrial de las enzimas estudiadas (incluyendo los sectores de alimentación y papel).

A causa de la alta multidisciplinariedad requerida el proyecto incluye grupos con experiencia en i) biotecnología (CIB-CSIC, ES, y UHEL, FI); ii) genética de hongos (RuG, NL, e INRA, FR); iii) ingeniería de peroxidases (USussex, GB) y iv) NMR (UFIR, IT) y difracción de rayos X (ETH, CH); junto con v) dos compañías productoras de enzimas con experiencia en producción de proteínas recombinantes (Frimond, BE, y Novozymes, DK). Este consorcio, con participantes de 8 países miembros de la UE y Suiza, da al proyecto una fuerte dimensión europea.

Nuevos métodos respetuosos con el medioambiente para el control del "pitch" en diferentes procesos de fabricación de papel

El primer objetivo es desarrollar métodos respetuosos con el medio ambiente para el control del "pitch" durante la fabricación de papel basados en: i) el estudio de los extraíbles de la madera durante la fabricación de pasta kraft de eucalipto y pasta TMP de Picea, y la identificación de los compuestos responsables de los depósitos de "pitch"; ii) cepas de hongos seleccionadas capaces de eliminar los extraíbles de ambos tipos de madera; iii) nuevas enzimas (nativas o modificadas) capaces de degradar los compuestos en las pastas o en los líquidos de proceso y iv) métodos físico-químicos mejorados para eliminar el "pitch" o disminuir su depositabilidad. El segundo objetivo es desarrollar los anteriores métodos a escala piloto incluyendo: i) optimización del crecimiento fúngico y formulación de inóculos; ii) protocolos optimizados para la producción de las nuevas enzimas desarrolladas., iii) combinación de tratamientos enzimáticos y físico-químicos; iv) papeo y blanqueo a escala piloto; v) análisis de las ventajas de los nuevos procesos en términos de eliminación de extraíbles, depositabilidad del "pitch", parámetros de proceso y toxicidad de los efluentes; vi) evaluación del

barinus); v) *Isolation and characterization of relevant enzymes (including new peroxidase)*; vi) *NMR spectroscopy and crystallographic analysis (to obtain molecular models and structural information on new and recombinant enzymes)*; vii) *Structure-function and protein modification studies (for elucidation of key aspects of enzyme catalysis and production of improved variants)*; viii) *Fermentation technology for metalloenzyme production (using the most adequate host systems)*; and ix) *Evaluation of the industrial application of the enzymes studied (including food and pulp-paper sectors)*.

Because of high multi-disciplinarity required, the project consortium includes groups with expertise in: i) biotechnology (CIB-CSIC, ES; and UHEL, FI); ii) fungal genetics (RuG, NL; and INRA, FR); iii) peroxidase engineering (USussex, GB); and iv) protein NMR (UFIR, IT) and x-ray diffraction analyses (ETH, CH); together with v) two enzyme-producing companies with experience in recombinant protein production (Frimond, BE; and Novo Nordisk, DK). The above consortium (with partners from eight EU members and Switzerland) gives the proposal a strong European dimension.

New environmentally-sound methods for pitch control in different paper pulp manufacturing processes

To design environmentally-sound methods for pitch control during manufacture of selected paper pulps based on: i) previous balance of extractive-derived compounds during manufacturing of eucalypt Kraft pulp and spruce TMP pulp, and identification of compounds responsible for pitch deposition; ii) selected fungal strains removing extractives from both wood types; iii) new (native or engineered) enzymes being able to degrade target compounds in pulps or liquids; and iv) improved physicochemical methods to remove pitch or decrease depositability. To develop the above pitch control methods at a pilot scale including: i) fungal growth optimization and formulation of inocula to treat wood; ii) optimized protocols for production of the new enzymes developed; iii) combined enzymatic-physicochemical treatments; iv) pilot-scale pulping and bleaching including the above optimized treatments; v) analysis of advantages of the new processes in terms of extractive removal, pitch depositability, pulp and process parameters, and effluent toxicity; and vi) evaluation of their commercial interest for different raw materials, pulping processes and world markets.

interés comercial para diferentes materias primas, procesos de fabricación y mercados mundiales.

El plan de trabajo incluye estudios sobre los compuestos extraíbles con objeto de saber como son modificados químicamente durante la fabricación de pasta, cuales sobreviven en los procesos de pasteo y blanqueo, como se modifican la estabilidad y depositabilidad del "pitch" coloidal y cuales son los principales compuestos responsables de los depósitos y las reacciones implicadas en su formación. Se desarrollarán tratamientos biológicos para reducir la formación de depósitos y obtener ventajas adicionales (ambientales o de proceso). Se investigarán hongos seleccionados y se optimizará la inoculación y condiciones de tratamiento (para maderas de eucalipto y Picea) comparados con Cartapip™. Estos estudios incluirán experimentos de pasteo/blanqueo para evaluación de las propiedades de cocción, refinado y fabricación de papel, producción de inóculos microbianos y el tratamiento de la madera a escala piloto. El uso de enzimas ofrece ventajas adicionales para el control del "pitch" al poder incluirlas en diferentes fases del proceso. Actualmente, la Resinase™ y otras lipasas se están comercializando para el proceso de tratamiento del "pitch". Sin embargo éstas son de poca utilidad en muchos procesos de fabricación de pasta de papel ya que su acción se limita a los glicéridos, que en muchos casos no son los principales responsables de los depósitos. Para ampliar el potencial de los tratamientos enzimáticos para el control de "pitch" se explorarán dos alternativas: i) la búsqueda de nuevas enzimas en hongos que degraden eficazmente los extraíbles del eucalipto y la Picea (utilizando compuestos sencillos, "pitch" sintético y otros sustratos); y ii) mejorando las enzimas industriales ya conocidas mediante las herramientas proporcionadas por la ingeniería genética. Finalmente varios métodos físico-químicos mejorados para el control del "pitch", basados en la flotación por aire disuelto y la ultrafiltración serán investigados y se evaluará su complementariedad con los tratamientos biológicos. El proyecto incluye grupos con experiencia en microbiología, biotecnología, ingeniería y química; centros técnicos y compañías de biotecnología y producción de papel, de 5 países europeos.

The work plan established includes studies on wood extractives compounds to show how they are chemically-modified or degraded in the course of the pulp manufacturing processes, which of them survive pulping and bleaching, how colloidal pitch stability and depositability are modified, and what are the main compounds responsible for the formation of deposits as well as the main reactions and mechanisms involved. Then, biological treatments will be developed with the aim of reducing deposit formation and obtaining additional environmental or process improvements. Selected fungal strains will be investigated and optimized inoculation and treatment conditions (for both eucalypt and spruce wood) defined at the laboratory scale (compared with Cartapip™). These studies will include pulping/bleaching experiments for evaluation of cooking, refining and papermaking properties, the subsequent production of microbial inocula, and the treatment of wood at pilot-scale. The use of enzymes offers additional advantages for pitch control due to the possibility of including them at different stages of pulping and bleaching. Currently, Resinase™ and other lipases are being commercialized for pitch control. However, they are of limited utility in many pulping processes because their action is limited to glycerides, which in many cases are not the main responsible for pitch deposition. In order to expand the potential of enzymatic treatments for pitch control, two alternatives will be explored based on: i) the search for new enzymes in fungi efficiently-degrading eucalypt and spruce extractive compounds (using simple target compounds, "synthetic pitch" and other substrates); and ii) enlarging the potential of the already-known industrial enzymes for pitch control by the use of tools provided by the genetic engineering. Finally, several improved physico-chemical methods for the control of pitch deposition based on dissolved-air flotation and ultrafiltration technologies, and their complementarity with the biological ones will be investigated. The project includes academic groups with expertise in microbiology, biotechnology, engineering and chemistry, technical centers, and biotechnology and paper pulp-producing companies, from 5 EU countries.

Nuevas peroxidasas y oxidasas de *Pleurotus*: Estudios estructurales y expresión heteróloga en relación con la biodegradación de compuestos aromáticos de interés industrial o medioambiental

El proyecto se centra en dos enzimas (una peroxidasa y una oxidasa) que actúan sinérgicamente en la degradación de la lignina por *Pleurotus eryngii*, un hongo de interés biotecnológico debido a su capacidad para degradar la lignina selectivamente. La peroxidasa es diferente de las otras peroxidasas descritas hasta el presente y posee gran versatilidad para degradar compuestos aromáticos recalcitrantes ya que comparte propiedades catalíticas de las peroxidasas anteriormente conocidas, la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (y también oxida algunos compuestos que no son oxidados eficazmente por estas últimas enzimas). La segunda enzima es la aril-alcohol oxidasa, una nueva oxidasa caracterizada por su capacidad para generar peróxido de hidrógeno durante la oxidación de sustratos aromáticos. Ambas enzimas fueron descritas y caracterizadas por primera vez en el CIB y han sido recientemente clonadas y secuenciadas.

Los objetivos generales del proyecto son: i) profundizar en el conocimiento de los aspectos más relevantes de la estructura molecular de las nuevas peroxidasas y oxidasas (descubiertas en hongos del género *Pleurotus*) en relación con su actividad catalítica, mediante la cristalización y el modelado molecular y la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida (que permitirán posteriormente modificar sus propiedades catalíticas, de estabilidad u otras en relación con diferentes tipos de aplicaciones), ii) estudiar y optimizar la expresión de los correspondientes genes (varios de ellos clonados recientemente) en organismos modelo y en los sistemas utilizados para la producción industrial de enzimas así como los procedimientos de producción y purificación de las enzimas recombinantes obtenidas, y iii) investigar los aspectos más relevantes de los mecanismos de acción de las enzimas nativas y sus variantes obtenidas por mutagénesis dirigida, sobre algunos sustratos aromáticos de interés industrial o medioambiental (a la luz de los modelos moleculares obtenidos).

Novel peroxidases from *Pleurotus*: Structural studies and heterologous expression related to biodegradation of aromatic compounds with industrial or environmental interest

*The project focuses on two enzymes (a peroxidase and an oxidase) acting synergistically for lignin degradation by *Pleurotus eryngii*, a fungus of biotechnological interest due to its capabilities to degrade lignin selectively. The peroxidase is different from other peroxidases described till the present, and has high versatility for degradation of recalcitrant aromatic compounds, since it shares catalytic properties of the well-known lignin peroxidase and Mn-peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* (and oxidizes also some compounds that are not efficiently oxidized by the latter enzymes). The second enzyme considered is aryl-alcohol oxidase, a new oxidase characterized by its ability to generate hydrogen peroxide during oxidation of aromatic substrates. Both enzymes were described and characterized for the first time at the CIB, and were recently cloned and sequenced. The present project includes: i) structural analysis of these proteins (x-ray diffraction after crystallization, and molecular modeling) and modification of relevant amino-acid residues (by specific chemical reactions and site-directed mutagenesis); ii) studies on heterologous expression in prokaryotic and eukaryotic systems (including microorganisms of industrial interest); and iii) evaluation of catalytic properties and industrial or environmental interest of the native enzymes and their variants including determination of kinetic constants and studies on their action on simple xenobiotics, lignin or lignin-derived compounds in paper pulp samples provided by ENCE (the second manufacturer of eucalypt paper pulp in the world).*

Utilization of non-woody fibres: New bleaching sequences for the manufacture of pulps with different degrees of delignification and different industrial uses

The general objective of this research is to improve the manufacture of pulp from certain annual plants by studying specially bleaching (without elemental chlorine (ECF) and chlorine compounds (TCF)), stressing the use of biotechnological techniques. Particular objectives are: 1) To improve the manufacture of pulps from flax and kenaf; 2) To obtain unbleached pulps with different degrees of delignification; 3) To develop new elemental and totally chlorine free bleaching processes

Utilización de fibras no madereras: Nuevas secuencias de blanqueo para la fabricación de pastas con diferentes grados de deslignificación y distintos usos industriales

El principal objetivo de esta investigación es la mejora en la fabricación de pasta de papel a partir de ciertas plantas anuales, centrándose principalmente en el estudio del blanqueo (sin la aplicación de cloro elemental (ECF) y sus derivados (TCF)) con la utilización de técnicas biotecnológicas.

En particular, los objetivos son los siguientes: 1) Mejora en la fabricación de pastas a partir de lino y kenaf; 2) Obtención de pastas crudas con diferentes grados de deslignificación; 3) Desarrollo de nuevos métodos de blanqueo sin cloro elemental y derivados (ECF y TCF) encaminados a su utilización en especies no madereras (lino y kenaf); 4) Utilización de técnicas biotecnológicas basadas en tratamientos enzimáticos: xilanasas (comerciales), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (laboratorio); 5) Determinación del mediador de MnP y lacasa apropiado para la aplicación en el blanqueo comercial; 6) Estudio de la influencia de los tratamientos enzimáticos y del blanqueo ECF y TCF en las propiedades de la pasta y de los efluentes; 7) Producción de enzima (MnP y lacasa); 8) Estudio de la influencia de los tratamientos enzimáticos y del blanqueo ECF y TCF en relación con las propiedades de las pastas (incluyendo envejecimiento y refino), de los papeles (incluyendo propiedades ópticas y de resistencia) y de los efluentes (incluyendo DQO y color); y 9) Realización de pruebas industriales.

Los objetivos del proyecto se enmarcan dentro de las prioridades científico-técnicas del Programa Nacional de "Tecnologías de Procesos Químicos" en sus apartados: "1.1) Nuevos principios de diseño que optimicen procesos, abran nuevos campos de producción o supongan ventajas notables desde el punto de vista medioambiental; 1.4) Innovación de procesos convencionales. Incorporación de tecnologías ya probadas que puedan suponer mejoras en el rendimiento y selectividad; y 3.1) Mejora del ciclo de vida y de las propiedades del producto. Configuración del proceso condicionada por la calidad del producto final. Análisis de los parámetros de definición de calidad para su optimización".

Los principales resultados que se esperan obtener son los siguientes: a) Mejora en la utilización de especies no madereras con el principal propósito de la obtención de pasta de papel; b) Mejora en el blanqueo de especies no madereras utilizando

(ECF and TCF), for the processing of non wood species: flax and kenaf; 4) Use of biotechnological techniques based on enzymatic treatments: xylanases (commercial), manganese peroxidase and laccase (laboratory); 5) To find out appropriate manganese peroxidase and laccase mediator to apply in commercial bleaching; 6) To study the influence of enzymatic treatments and ECF and TCF bleaching on pulp and effluent properties; 7) Enzyme production (manganese peroxidase and laccase); 8) To study the influence of enzymatic treatments and ECF and TCF bleaching in relation to pulp (aging, refining..) and paper properties (tensile..) as well as effluent properties (COD, color..); and 9) Industrial bleaching, refining and pulp and paper properties.

This proposal fully complies with the following priorities of the Spanish R&D Programme of Chemical Technologies: "1.1) Nuevos principios de diseño que optimicen procesos, abran nuevos campos de producción o supongan ventajas notables desde el punto de vista medioambiental; 1.4) Innovación de procesos convencionales. Incorporación de tecnologías ya probadas que puedan suponer mejoras en el rendimiento y selectividad; and 3.1) Mejora del ciclo de vida y de las propiedades del producto. Configuración del proceso condicionada por la calidad del producto final. Análisis de los parámetros de definición de calidad para su optimización".

The main expected results are: a) Improvement of utilization of non-woody plants in order to obtain mainly paper pulp; b) Improvement of bleaching of non-woody pulps by less contaminating methods; c) Saving bleaching chemicals by the use of biotechnological methods without impairing pulp properties; d) Improvement of enzyme-mediator systems applied to commercial bleaching processes; e) Yield increase in relationship with raw material; and f) Better understanding of the mechanism of bleaching with non polluting methods.

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 degra-

métodos menos contaminantes; c) Ahorro en los reactivos de blanqueo mediante la utilización de métodos biotecnológicos sin afectar en las propiedades finales de la pasta; d) Mejora de los sistemas enzima/mediador aplicados a los procesos de blanqueo comerciales; e) Incremento del rendimiento en relación a la utilización de materias primas; y f) Mejor comprensión del mecanismo de blanqueo según métodos no contaminantes y su relación con las propiedades de permanencia de las pastas.

Biodegradación de compuestos aromáticos contaminantes de suelos por hongos del género *Pleurotus*

El objetivo es la utilización de hongos basidiomicetos del género *Pleurotus* para la degradación de xenobióticos, con vistas a desarrollar estrategias de biorremediación de suelos en la comunidad de Madrid. Esta línea de investigación se basa en la inespecificidad del sistema degradativo desarrollado por estos hongos para despolimerizar y mineralizar la lignina, polímero aromático estructuralmente relacionado con muchos de los compuestos que causan problemas de contaminación en suelos. El plan de trabajo incluye: i) la evaluación de la capacidad de los hongos del género *Pleurotus* para degradar varios xenobióticos modelo (incluyendo fenol, 2,4-diclorofenol, tolueno y benzo(a)pireno); ii) el estudio detallado del sistema enzimático implicado en el proceso de biodegradación (incluyendo el papel de las enzimas oxidativas y sus posibles mediadores redox, los sistemas de reducción asociados al micelio y los mecanismos de generación de especies activas de oxígeno); y iii) la biorremediación de un suelo contaminado con objeto de evaluar la eficacia del hongo seleccionado para eliminar los xenobióticos y el destino de los diferentes metabolitos formados en las diferentes fracciones del suelo (validación en microcosmo).

Alteración microbiana de los discos compactos

Esta línea de trabajo comenzó con el estudio de la alteración biológica de un disco compacto (CD) en colaboración con el Museo Nacional de Ciencias Naturales del CSIC. Este CD-audio fue encontrado en Belice, un pequeño país tropical situado entre Méjico y Guatemala, y presentaba síntomas de biodegradación progresiva. Los CDs están constituidos por una base de policarbonato, una capa metálica reflectora (a menudo aluminio) y una capa protectora de laca. En los CD-audio la información se

*de 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).*

Microbial alteration of compact disks

This work was initiated with the study of the biological alteration of a compact disk (CD) carried out in collaboration with the Museum of Natural Sciences of CSIC. This CD-audio was found in Belize, a small country between Mexico and Guatemala, and showed evident symptoms of progressive biodegradation. A CD consists of a polycarbonate support, a metal (often aluminum) reflection layer, and a thin layer of protective lacquer. In the CD-audio the information is pregrooved on polycarbonate and the lecture is produced when the laser is reflect on the metal. The alteration on the CD from Belize consisted of zones where the metal had disappeared, and the information was, therefore, destroyed. Fungal hyphae were observed in these areas and a Geotrichum-type fungus was isolated. The fungus penetrated the CD by the border (without lacquer protection) and under the favorable climatic conditions of Belize (~30°C

encuentra grabada en el policarbonato, y la lectura se produce al reflejarse un haz láser sobre la fina capa de metal que lo recubre. La alteración del CD se manifestaba principalmente en la desaparición parcial de la capa metálica, haciendo por tanto imposible la lectura del disco. Los estudios realizados pusieron de manifiesto la existencia de hifas fúngicas entre las capas del CD y dieron lugar al aislamiento de un hongo de tipo *Geotrichum*. El hongo penetró en el CD por los bordes, no cubiertos por la laca, y colonizó el interior gracias a las favorables condiciones climáticas existentes (~30°C y ~90% humedad). Los objetivos inmediatos de esta nueva línea son: i) comprobar si se puede reproducir la infección de los CD in vitro, ii) comprobar si este hongo es capaz de degradar el policarbonato y/o el resto de los materiales que componen estos soportes informáticos, y iii) investigar otras posibles aplicaciones biotecnológicas de éste u hongos relacionados en la biodegradación/reciclado de materiales plásticos. La trascendencia de estos estudios es evidente al constituir los CD uno de los soportes de información más utilizados en nuestros días.

and ~90% humidity) colonization was produced. The objectives of this new line are: i) to reproduce the CD infection in vitro, ii) to study if the isolated fungus is able to degrade polycarbonate and/or other CD materials, and iii) to study the biotechnological applications of Geotrichum and other fungi for biodegradation/recycling of plastic materials. The impact of these studies is evident since CDs are one of the most widespread information supports in our days.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM-Medio Ambiente, 07M/0051 (1998-2001)
- FEDER/CICYT-Medio Ambiente, 1FD97-0742 (1999-2001)
- FEDER/CICYT-Tecnologías Químicas, 2FD97-896-C02-02 (1999-2001)
- CICYT-Biotecnología, BIO99-908 (1999-2002)
- V PM UE-Agricultura Sostenible, QLK5-99-1357 (2000-2003)
- V PM UE-La Fábrica Celular, QLK3-99-590 (2000-2003)
- CAM-Contrato Programa-Genómica – Proteómica (2000-2003)
- Grupo empresarial ENCE , Contrato ENCE-CSIC, (2002-2004)

Tesis/Theses

- Olga Calero Rueda. Búsqueda de enzimas fúngicas con actividad esterasa para el control biológico del "pitch". Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2001. Directora: Dra. María Jesús Martínez.
- Lucilia C. Caramelo. Búsqueda de peroxidases ligninolíticas en *Pleurotus* usando KTBA y dímeros modelo de lignina como sustratos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2002. Director. Dr. Angel T. Martínez.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Camarero, S., Bocchini, P., Galletti, G.C., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2001) Compositional changes of wheat lignin by a fungal peroxidase analyzed by Pyrolysis-GC/MS. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 58/59, 413-423.
- Del Río, J.C., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2001a) Py-GC-MS study of *Eucalyptus globulus* wood treated with different fungi. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 58/59, 441-453.
- Del Río, J.C., Gutiérrez, A., Romero, J., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2001b) Identification of residual lignin markers in eucalypt kraft pulps by Py-GC/MS. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 58/59, 425-433.
- García-Guinea, J., Cárdenes, V., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2001a) Fungal bioturbation paths in a compact disk. *Naturwissenschaften* 88, 351-354.
- Gómez-Toribio, V., Martínez, A.T., Martínez, M.J., and Guillén, F. (2001) Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*: H₂O₂ generation and the influence of Mn²⁺. *Eur. J. Biochem.* 268, 4787-4793.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2001) The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends Biotechnol.* 19, 340-348.
- Martínez, A.T., Camarero, S., Gutiérrez, A., Bocchini, P., and Galletti, G. C. (2001) Studies on wheat lignin degradation by *Pleurotus* species using analytical pyrolysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 58/59, 401-411.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Camarero, S., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2001) A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 116-122.
- Tamerler, C. B., Martínez, A.T., and Keshavarz, T. (2001) Production of lipolytic enzymes in batch cultures of *Ophiostoma piceae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 991-996.
- Varela, E., Guillén, F., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2001) Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 107-113.
- Álvarez-Rodríguez, M.L., López-Ocaña, L., López-Coronado, J.M., Rodríguez, E., Martínez, M.J., Larriba, G., and Coque, J.-J. R. (2002) Cork taint of wines: Role of filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5860-5869.
- Calero-Rueda, O., Plou, F.J., Ballesteros, A., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2002) Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. *BBA. Proteins Proteomics.* 1599, 28-35.
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J.C., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2002) Flax pulp bleaching and residual lignin modification by laccase-mediator systems. *Progr. Biotechnol.* 21, 213-222.
- Del Río, J.C., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2002a) Identification of a novel series of alkylitaconic acids in wood cultures of *Ceriporiopsis subvermispora* by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 62-68.
- Del Río, J.C., Speranza, M., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2002b) Lignin attack during eucalypt wood decay by selected basidiomycetes: a Py-GC/MS study. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 64, 421-431.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez-Íñigo, M.J., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2002) Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1344-1350.
- Martínez, A.T. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 425-444.
- Pérez-Boada, M., Doyle, W. A., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M.J., Martínez, A.T., and Smith, A.T. (2002) Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of in vitro folding. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 518-524.

- Saparrat, M.C.N., Guillén, F., Arambarri, A.M., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2002) Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white-rot basidiomycete *Corioloropsis rigida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1534-1540.
- Speranza, M., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., and Martínez, A.T. (2002) Wood and pulp localization of sterols involved in pitch deposition using filipin fluorescent staining. *J. Pulp Paper Sci.* 28, 292-297.

Artículos de divulgación/General articles

- García-Guinea, J., Cárdenes, V., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2001) Un hongo que se come los CD. *Mundo Científico* 226, 72-73.
- Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2002) Hongos capaces de crecer en los "compact disks" y destruir la información. *Heliatom* 13-16.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Ferreira, P., Guillén, F., Ruiz-Dueñas, F.J., García de Lacoba, M., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H., and Martínez, A.T. (2002) Structure-function studies on fungal aryl-alcohol oxidase. En: *Flavins and flavoproteins*, S.K.Chapman, R.N.Perham y N.S.Scrutton, eds. Rudolf Weber, Berlin, pp. 155-160.

Patentes/Patents

- Calero-Rueda, O., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Muñoz, C., Plou, F.J., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2001) Esterasa, procedimiento de obtención y su utilización para el control enzimático de los depósitos de brea (pitch) formados durante la fabricación de pasta de papel: Patent (Spain) No. solicitud P200100618
- Calero-Rueda, O., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Muñoz, C., Plou, F.J., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2002) Procedimiento para el control enzimático de los depósitos de brea ("pitch") formados durante la fabricación de pasta de papel utilizando una esterasa que hidroliza tanto triglicéridos como ésteres de esteroides: Patent (International) No. solicitud PCT/ES02/00120
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J.F., del Río, J.C., Gutiérrez, A., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2001) Nuevos procedimientos para el blanqueo enzimático libre de cloro de pastas de alta calidad obtenidas de plantas herbáceas o arbustivas: Patent (Spain) No solicitud P200102804
- García-Guinea, J., Cárdenes, V., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2001) Modificación del sistema de fabricación de discos compactos para evitar la destrucción física por microorganismos: Patent (Spain) No solicitud 200101866 (8-Aug-2001) (application):
- Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Barrasa, J.M., Martínez-Iñigo, M.J., Romero, J., Canaval, J., and Martínez, A.T. (2001) Procedimiento de eliminación microbiana de compuestos lipofílicos en la fabricación de pasta de papel a partir de madera de frondosas: Patent (International) No solicitud PCT ES01 00014
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J.F., del Río, J.C., Gutiérrez, A., Asther, M., Sigoillot, J.C., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2002) New method for chlorine-free enzymatic bleaching of high quality pulps obtained from non-wood plants. Patent (International) No. PCT/ES02/00603 (Spanish patent filed 17-Dec-01)

Bioquímica de Hongos

Biochemistry of Fungi

CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigadora de Carrera / Staff Scientist

MONIQUE NOVAES-LEDIEU
Investigadora Emérita / Emeritus Scientist

AMELIA PÉREZ CABO
Doctora Vinculada / Associated Scientist

DOLORES BERNARDO LÓPEZ
B. Predoctoral / Graduate Student

ROSA MARTÍNEZ DALMAU (Hasta X-2002)
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Micoparasitismo, Pared celular, *Agaricus bisporus*, *Verticillium fungicola*, Fungicida, Substratos de cultivo

Keywords: *Mycoparasitism, Cell wall, Agaricus bisporus, Verticillium fungicola, Fungicide, Cultivation substrates*

Bases celulares y moleculares del micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los cultivos industriales de champiñón (*Agaricus bisporus*)

Cellular and molecular basis of the *Verticillium fungicola* mycoparasitism on the *Agaricus bisporus* fruit bodies (cultivated mushroom)

La verticiliosis o "mole seca" de los cultivos industriales de champiñón está producida por el hongo hifomiceto *Verticillium fungicola*, que parasita los carpóforos del hongo superior *Agaricus bisporus* pero no su correspondiente micelio vegetativo. Estudios realizados en este laboratorio han puesto de manifiesto las diferentes estructuras químicas de las paredes celulares de las hifas del micelio agregado de *A. bisporus*, de las paredes del correspondiente micelio vegetativo, así como también de las paredes del micopatógeno *V. fungicola*. También hemos demostrado que *V. fungicola* sintetiza "in vitro" las enzimas necesarias para degradar ambas clases de paredes celulares de *A. bisporus*, mientras que solo es capaz de digerir "in vivo" las paredes celulares de las hifas agregadas. En el momento actual estamos estudiando la primera interacción inespecífica que se produce entre ambos hongos, debida a la presencia de hidrofobina en sus respectivas paredes celulares. Igualmente estamos

*The verticillium disease or "dry bubble" of the cultivated mushroom is caused by the fungus hyphomycete *Verticillium fungicola*, which parasitizes the higher fungus *Agaricus bisporus* fruit bodies, but does not parasitize the corresponding vegetative mycelium. Studies carried out in this laboratory have shown the different hyphal wall chemical structure of the *A. bisporus* aggregated mycelium, that of the vegetative mycelium and also that of the mycoparasite *V. fungicola*. The necessary enzymes to degrade both kinds of *A. bisporus* cell walls are synthesized "in vitro" by *V. fungicola*, whereas the mycopathogen is only able to digest "in vivo" the hyphal walls of fruit bodies. At present we are studying the non-specific interaction produced between both fungi due to the presence hydrophobin in their respective cell walls and also the more specific interaction between certain polysaccharide of the *V. fungicola* cell walls (glucogalactomannan) with determined protein (lectin) in the hyphal*

estudiando la interacción más específica entre cierto polisacárido de las paredes celulares de *V. fungicola* (glucogalactomano) con una determinada proteína (lectina) de las paredes celulares de las hifas de los carpóforos de *A. bisporus*, que podría ser la causa del reconocimiento y/o unión entre el micoparásito y el hospedador, mecanismos previos al desarrollo de la infección que conduce finalmente a la necrosis de los champiñones.

Modo de acción del fungicida Prochloraz-Mn sobre las paredes celulares del micoparásito *Verticillium fungicola*

El Prochloraz-Mn es el fungicida utilizado rutinariamente en los cultivos industriales de champiñón *Agaricus bisporus* para controlar la verticiliosis o "mole seca" producida por *Verticillium fungicola*, y evitar las cuantiosas pérdidas económicas ocasionadas en el sector. Nuestros estudios previos sobre los mecanismos celulares y moleculares de dicha patogénesis han mostrado el importante papel desempeñado por las paredes celulares tanto del micopatógeno (*V. fungicola*) como del hospedador (*A. bisporus*). Por todo ello y dado el uso intensivo del citado fungicida en dichos cultivos, el estudio del efecto que produce el Prochloraz-Mn sobre la estructura de dichas paredes celulares complementa los estudios que estamos llevando en paralelo para tratar de controlar la enfermedad. Resultados preliminares demuestran la inhibición parcial de la síntesis de proteínas de las paredes celulares de *V. fungicola* junto con una modificación estructural de ciertos componentes polisacáridicos (los glucanos y más particularmente los glucogalactomananos) de estas mismas paredes celulares.

Caracterización de la calidad de los substratos para el cultivo de hongos superiores comestibles mediante diferentes parámetros microbiológicos y bioquímicos

Los substratos que se utilizan para el cultivo de los hongos superiores comestibles están compuestos básicamente por subproductos lignocelulósicos, adicionados, en algunos casos, con otros componentes orgánicos más ricos en nitrógeno. Los substratos utilizados para el cultivo de *Agaricus bisporus* (champiñón) requieren un proceso de compostaje o fermentación en estado sólido que tradicionalmente ha constado de una Fase I de fermentación libre y una Fase II de fermentación controlada. Cada una de estas fases debe contar con unos marcadores micro-

walls of the A. bisporus fruit bodies. This last fact could be the cause of the recognition and/or union between the mycoparasite and the host, previous mechanisms to the mycosis development which finally leads to the mushroom necrosis.

Mode of action of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell walls of the mycoparasite *Verticillium fungicola*

*Prochloraz-Mn is the fungicide routinely used in industrial cultures of the mushroom *Agaricus bisporus* to control the verticillium disease or "dry bubble" produced by *Verticillium fungicola* to avoid the heavy economic losses caused in the sector. Our preliminary studies on the cellular and molecular mechanisms of such pathogenesis have shown the important role played not only by the cell walls of the the mycopathogen (*V. fungicola*) but also by those of the host (*A. bisporus*). For this reason and due to the intensive use of the cited fungicide in the mushroom industrial cultures, the study of the effect produced by Prochloraz-Mn on the cell wall structure complements the studies carried out in parallel trying to control the disease. Preliminary results point out a partial inhibition of cell wall protein synthesis in *V. fungicola*, as well as a structural modification of certain polysaccharide components (the glucans and particularly the glucogalactomannans) in the same cell walls.*

Characterization of the quality of the substrates for edible higher fungi cultivation by means of different microbiological and biochemical parameters

*The substrates utilized for the cultivation of edible mushrooms are mainly composed of lignocellulosic by-products, in some cases activated with other richer nitrogenous components. The substrates for *Agaricus bisporus* (mushroom) cultivation require a composted or solid state fermentation process that traditionally consisted of Phase I, or the free fermentation, and Phase II, or the controlled fermentation. Each one of these two phases should show some microbiological and/or biochemical markers in order to supply standardized quality and controlled substrates. As microbiological markers in Phase II we are evaluating mesophilic and termophilic actinomycetes and fungi (particularly *Scyialidium termophilum*), while in Phase I, as the fermentation conditions are not completely controlled, huge variations and consequently a very distinct microbial flora are*

biológicos y/o bioquímicos con el fin de proporcionar unos sustratos con una calidad contrastada y estandarizada. Como marcadores microbiológicos se están evaluando en la Fase II actinomicetos y hongos mesófilos y termófilos (particularmente *Scytalidium thermophilum*), dado que la Fase I, hasta que no se definan más completamente sus condiciones, presenta enormes variaciones y por ello una flora microbiana muy distinta. Entre los marcadores bioquímicos, igualmente de la Fase II, hemos seleccionado los constituyentes mayoritarios de la lignocelulosa: celulosa, hemicelulosa y lignina, así como sus correspondientes disacáridos de glucosa, xilosa y manosa (celobiosa, xilobiosa y manobiosa), alcohol veratrílico, y las enzimas hidrolíticas celulasa, hemicelulasa y lacasa.

Paralelamente se está iniciando un estudio semejante sobre los sustratos para el cultivo de setas (*Pleurotus ostreatus*), que requieren sustratos menos fermentados y por ello más sencillos, habiendo podido demostrar hasta el momento la acción fermentativa selectiva de diferentes especies de *Bacillus*.

shown. Among the biochemical markers, also in Phase II, we have selected the lignocellulosic major components: cellulose, hemicellulose and lignine, as well as their corresponding disaccharides of glucose, xylose and mannose (cellobiose, xylobiose and mannobiose), veratryl alcohol and the hydrolytic enzymes cellulase, hemicellulase and laccase.

*In parallel we are initiating a similar study of the substrates for the cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) which requires less fermented or more simple substrates, demonstrating up to now the selective fermentative action of different species of *Bacillus*.*

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, AGL 2001-1885 (2001-2004)
- Comunidad de Castilla-La Mancha, 188/CH-51 (2001-2004)
- CICYT, REN 2002-00660(2002-2005)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Bernardo, D., Novaes-Ledieu, M., Pérez Cabo, A., Gea Alegría, F.J., and García Mendoza, C. (2002) Effect of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell wall structure of *Verticillium fungicola*. *Int. Microbiol.* 5, 121-125.
- Calonje, M., Bernardo, D., Novaes-Ledieu, M., and García Mendoza, C. (2002) Properties of a hydrophobin isolated from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Can. J. Microbiol.* 48, 1030-1034.
- García Mendoza, C. (2002) El cultivo de los hongos superiores comestibles, un recurso de desarrollo ineludible en el siglo XXI. *Anal. Real Acad. Farm.* 68, 753-776.

Artículos de Divulgación/Press Articles

- García Mendoza, C. (2002). La Sociedad Española de Microbiología a lo largo del siglo XX. En: Historia de la Sociedad Española de Microbiología a lo largo del siglo XX. Fundación Ramón Areces-CSIC. pp 16-118.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- García Mendoza, C., Bernardo, D., Pérez Cabo, A. y Novaes-Ledieu, M. (2003) Bioquímica del empleo de Procloraz-Mn: Modificaciones estructurales en las paredes celulares de los micelios de *Agaricus bisporus* y *Verticillium fungicola* inducidas por el fungicida. En: Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados. Patronato de Promoción Económica. Diputación Provincial de Cuenca, (en prensa/in press).

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Pardo Núñez, J. and García Mendoza, C. (2002) Submerged fermentation of lignocellulosic wastes under moderate temperature conditions for oyster mushroom growing substrate. En: Mushroom Biology and Mushroom Products. Sanchez et al. (eds). UAEM, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (México). pp 271-278.
-

Virología en Acuicultura *Virology in Fish-Aquaculture*

SARA ISABEL PÉREZ PRIETO
Jefe de Grupo / Group Leader
M^a DEL CARMEN GUTIÉRREZ RUEDA (Hasta VI-2001)
SYLVIA RODRIGUEZ SAINT-JEAN
Investigadoras de Carrera / Staff Scientists

ALVARO GÓMEZ GONZÁLEZ (Hasta III 2001)
OLIVIA RODDOM (18 VI 2002)
B. Predoctorales / Graduate Students

LUIS MANUEL GUATA BENEIT
M^a MERCEDES SÁNCHEZ CARMONA
Personal Técnico / Technicians

A Olivia Roddom, In memoriam

Nuestro grupo quiere rendir un homenaje a la memoria de Olivia Roddom, joven becaria que inició en el CIB su contacto con el mundo de la investigación y supo vivir con nosotros meses de trabajo, entusiasmo e ilusión. Su alegría, bondad y fortaleza de ánimo hasta los últimos días de enfermedad, nos han dejado un recuerdo permanente. Su familia y amigos, en colaboración con la Asociación Española Contra el Cáncer y el British Council School, están promoviendo la creación de una beca de investigación que llevará su nombre.

Palabras clave: Virus de peces, IPNV, IHNV, Proteínas antivíricas, MX, Coinfecciones.

Keywords: Fish viruses, IPNV, IHNV, Virulence, Interferon, Antiviral proteins, mx, Dual-infections.

Caracterización de coinfecciones virales en salmónidos y diseño de métodos inmunológicos y moleculares de diagnóstico

Characterization of viral co-infections in salmonid fish and design of immunological and molecular methods of diagnostic

Nuestro laboratorio se ha centrado en estudios de caracterización de dos modelos de coinfecciones víricas heterólogas en Salmónidos que pueden producirse muy probablemente en nuestro país: El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en coinfección con el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) o con el rhabdovirus europeo de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). Las infecciones simples de estos virus son frecuentes en todos los países europeos en los que la acuicultura

Our laboratory focuses on the characterization of two models of heterologous co-infections in Salmonid fish, both having great probabilities of occurring in our country: The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) mixed with the infectious hematopoyetic necrosis virus (IHNV) or with the European rhabdovirus viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV). The single infections of Salmonid fish viruses are frequent in all the European countries in which Aquaculture is a relevant activity, but co infections are interesting biological models for viral pat-

ra es una actividad importante pero las coinfecciones constituyen modelos biológicos interesantes y poco abordados para estudios de patogénesis viral. Además una coinfección tiene la particularidad de que el diagnóstico es más difícil, puesto que uno de los virus puede enmascarar al otro. El diseño y optimización de nuevos métodos de detección, son de gran interés porque, hasta ahora, el mejor método de control de estas enfermedades es un diagnóstico precoz y eficaz.

Hemos establecido *in vitro* los dos modelos-tipo de coinfección heteróloga Birnavirus-Rhabdovirus siguiendo las pautas que definen una coinfección natural que habíamos podido determinar en el transcurso de un proyecto anterior. Hemos aplicado tres tipos de técnicas diagnósticas rápidas: Inmunofluorescencia indirecta clásica, citometría de flujo, y RT-PCR. La técnica de referencia siempre es el aislamiento en cultivos celulares e identificación con antisueros específicos.

El resultado teórico más relevante ha sido el descubrimiento de la diferencia de interacciones que se establecen entre el IPNV y los dos rhabdovirus, pese a la proximidad taxonómica de estos, y a la similitud genética y antigénica. Esto puede señalar importantes diferencias en algunas de las fases de sus ciclos de multiplicación o de sus requerimientos, y tales características podrían ser utilizadas como herramientas de trabajo en estudios de patogénesis de rhabdovirus. Hemos demostrado que se produce interferencia entre el IPNV y el IHNV en coinfección, y que esta interferencia se hace más patente con cada pase sucesivo, mientras que en la coinfección con VHSV, aparentemente ninguno de los virus compete por la maquinaria celular y no se observa una disminución del título infectivo, ni en un primer pase, ni en pases sucesivos de esta coinfección. Además de las consideraciones teóricas, este hecho tiene una inmediata repercusión en términos prácticos, porque las posibilidades de detección por técnicas habituales del IPNV y VHSV es la misma, ya se presenten en infecciones individuales o dobles. No así en el caso del IHNV en coinfección con el IPNV, para el que hemos desarrollado un protocolo de PCR anidada que permite diagnosticar cantidades mínimas de IHNV en presencia del IPNV.

En cuanto a la caracterización molecular de la coinfección, para estudiar la posible aparición de alteraciones genéticas en los virus interferentes, y para la búsqueda de marcadores moleculares de virulencia, hemos secuenciado los genes que codifican los epítopos antigénicos de ambos virus, el gen VP2 del IPNV y el gen G del IHNV, en una muestra S46 de una coinfección

hogenesis studies, that have been scarcely approached. Another characteristic of co-infection is that diagnoses is more difficult, as one of the viruses can mask the other. Design and optimization of detection methods are of great interest because, up to now, the best method for the control of fish viral diseases is a rapid and efficient diagnosis

*We have established *in vitro* two models of heterologous Birnavirus-Rhabdovirus co-infections, following the standards of a natural co-infection we had previously studied. We have performed three types of rapid diagnostic techniques : indirect immunofluorescence, flow cytometry and RT-PCR. The reference method was always the isolation of virus in culture cells and identification by specific antisera. The most significant theoretic result was the discovery of differences in the established interactions between IPNV and IHNV or VHSV, despite of their close taxonomic position and their genetic similarity. This observation may indicate important differences in some of the steps of the growth cycles of IHNV and VHSV or their biological demands, and such particularities would be used as tools for studies of fish rhabdovirus pathogenesis. We have demonstrated that interference of IHNV mediated by IPNV is produced in co-infection, and it becomes clearer after successive passages, while in IPNV-VHSV co-infection, seemingly none of the viruses compete for the cellular machinery and lost of infective titers was not observed neither after a first passage, nor after successive others. Besides theoretic considerations, the matter has immediate practical repercussion because the possibilities for an efficient detection of IPNV or VHSV by classical methods are the same, being either a single infection or a co-infection. It wasn't so in the case of IPNV in co-infection with IHNV, for which we have developed a nested-PCR assay that permits the diagnoses of minimal quantities of IHNV in presence of IPNV.*

With regard to the molecular characterization of viral co-infections we have sequenced the genes codifying for the antigenic epitopes of both viruses, the VP2 gene of IPNV and the G gene of IHNV, from a wild co-infection (sample S46, conserved at our strain collection). The observed substitutions according to the published reference strains does not explain interference. Sequences were deposited at GenBank access numbers Y18854 and AJ011774.

*1) The development of *in vitro* assays for determining virulence were achieved using the small scale system of the aquaria of CIB and the facilities at the Salmon Disease Center of*

ción natural que conservamos en nuestra colección de cepas. Las alteraciones encontradas no explican la interferencia observada. Las secuencias se depositaron en GeneBank, códigos de acceso Y18854 and AJO11774.

En los ensayos "in vivo" para determinar virulencia, además del uso del sistema de acuarios de pequeño volumen de que disponemos en el CIB, hemos contado con las instalaciones del Salmon Center Disease de la Universidad de Corvallis, Oregón (USA), gracias a la amabilidad de la Dra Jo-Anhe Leong y a la colaboración de la Dra Alonso, que ha sido becaria post-doctoral del grupo en ese laboratorio.

Diseño de métodos inmunológicos y moleculares para el diagnóstico precoz de infecciones producidas por el virus de linfocistis en los cultivos de doradas (*Sparus aurata*, L)

En colaboración con el Dr Juan José Borrego (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga), en este proyecto se han diseñado métodos diagnósticos basados en técnicas inmunológicas (ELISA, inmunoblot y citometría de flujo) y en técnicas moleculares (sondas DNA, hibridación DNA y PCR), para la detección precoz del el iridovirus linfocistis (FDLV), un virus que afecta a la dorada cultivada (*Sparus aurata*, L). Se dispone de diferentes cepas de FDLV, de antisueros específicos y de una sonda de DNA. El virus se detecta mal por medio de las técnicas estándares de cultivo en líneas celulares establecidas, es un virus con ciclo de multiplicación muy lento y con bajo rendimiento "in vitro". Por ello es de gran interés para el Sector de acuicultura marina, poseer técnicas fiables, sensibles, rápidas, e incruentas que permitan la detección de la infección en estados asintomáticos previos a la aparición de los cuadros sindrómicos producidos por el FDLV.

Inducción de proteínas antivíricas en salmónidos y estudio de su actividad frente a cepas de distinta virulencia

Los estudios sobre factores moleculares de virulencia y resistencia natural a la infección por virus, son frecuentes en mamíferos y aves pero solo recientemente se han iniciado en peces teleosteos. El objetivo de este proyecto es determinar la inducción, producción y actividad de proteínas antivíricas en Salmónidos y las interacciones entre estas proteínas y cepas de virus virulentas o atenuadas. Estas proteínas son componentes

Corvallis University (Oregón, USA). These were kindly provided by Dr Jo-Ann Leong with the cooperation of M. Alonso, post-doctoral fellowship of our group in that laboratory

Design of immunological and molecular techniques for the diagnostic of lymphocystis virus infections affecting cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.)

*In collaboration with Dr Juan José Borrego (Department of Microbiology, Sciences, Málaga University), we are designing diagnostic methods based on immunological (ELISA, immunoblot and flow cytometry) and molecular (DNA probes, DNA hybridisation and PCR) techniques for the detection of an iridovirus, named fish lymphocystis disease virus (FDLV), a virus affecting cultured gilt-head seabream. (*Sparus aurata* L). Several strains and specific antiserum of FDLV and a DNA probe obtained by our research team previously are available for their application. This FDLV can not be detected using standardised techniques of cell culture previous to the symptoms in the affected fish. Therefore, the design and development of sensitive, accurate, rapid, easily applicable and efficient techniques that allow the detection of these viruses in asymptomatic carrier fish previously to the appearance of infection signs, is priority for the fish farmers.*

Induction of antiviral proteins in Salmonid fish and study of their activity against virus strains of different virulence.

Research on molecular aspects of viral virulence and the natural resistance to viral infections are frequent in mammals and birds, but their study on fish has been recently started. The aim of this project is to determine the induction, expression and activity of antiviral proteins in Salmonid fish, and the interaction between these proteins and virulent or attenuated viral strains. The Mx proteins are important components of the antiviral response and form the first line of the body's defence against viral infections in mammals, but the antiviral function of the trout Mx proteins has not been satisfactorily established.

The main objectives of the project would be:

1) To analyse comparatively the nucleotide sequences of genome A from IPNV strains of different virulence, in order to define molecular markers for virulence.

importantes de la respuesta antivírica y forman la primera línea de defensa frente a las infecciones por virus, pero no está definido su modo de acción.

En este proyecto pretendemos desarrollar tres objetivos:

I) Analizar comparativamente secuencias de nucleótidos del segmento A del genoma del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), en cepas de distinta virulencia.

II) Estudiar la inducción de proteínas Mx en trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) y trucha común (*Salmo trutta fario*), su producción en diversos órganos y su actividad frente a aislados de IPNV de distinta virulencia.

III) Determinar la modulación de la cinética de una coinfección IPNV-IHNV inducida por interferón y proteína Mx.

La conexión entre virulencia y producción de proteína Mx mediada por interferón se determinará por primera vez en peces en este proyecto, que analizará el potencial del gen Mx para futuras modificaciones genéticas en estas u otras especies de interés.

*II) To study the induction of Mx proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common trout (*Salmo trutta*), the expression in organs and the activity against IPNV strains of different virulence.*

III) To determine modulation of the IPNV-IHNV dual infection kinetics, induced by interferon and Mx protein.

The connection between virulence and Mx production will be studied, for the first time, in this project, which will also analyse the potential of the Mx gene for future genetic modifications in these or other interesting fish species.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, AGF98-0837 (1998-2001)
- CICYT, MAR99-0609 (2000-2002)
- CICYT, AGL2001-1256 (2001-2004)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Pérez-Prieto, S.I., García Rosado, E., Rodríguez, S., Castro, D., and Borrego, J.J. (2001) Antigenic properties and experimental transmission to several fish species of a marine birnavirus isolated from sole (*Solea senegalensis*). *Veterinary Microbiology* 82, 11-25.
- Rodríguez, S., Alonso, M., and Pérez-Prieto, S.I. (2001) Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) from leukocytes of carrier rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathology* 36 (3), 139-146.

- Rodríguez, S., Borrego, J.J., and Pérez-Prieto, S.I. (2001) Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. *Journal of Virological Methods* 97, 23-31.
- Rodríguez, S., Roddom, O., Guaita, L., and Pérez Prieto, S. (2001) Estudio Preliminar de interacciones genéticas y virulencia en una coinfección interserotípica del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa. *Aquatics*, 13, Especial VIII Congreso Nacional de Acuicultura (<http://aquatic.unizar.es/N3/art1309/IPN.htm>).
- García-Rosado, E.; Castro; D., Cano; I., Pérez-Prieto, S.I., and Borrego, J.J. (2002) Serological techniques for detection of lymphocystis virus in fish. *Aquatic Living Resources* 15, 171-185.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Alonso, M., Rodríguez, S., and Pérez-Prieto, S.I. (2003) Virulence of IHNV and IPNV coinfection in rainbow trout and nucleotide sequence analysis of the IHNV glycoprotein gene". *Archives of Virology*. (en prensa/in press).
 - Rodríguez, S., Borrego, J.J., and Pérez-Prieto, S.I. (2003) Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Biology, Pathogenesis and Diagnostic Methods. *Advances in Virus Research*. (en prensa/in press).
-

Carbohidratos Microbianos

Microbial Carbohydrates

JUAN ANTONIO LEAL OJEDA
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

OUSSAMA AHRAZEM
B. Postdoctoral / Postdoctoral Fellow

JESÚS LÓPEZ RAMÍREZ
Personal Técnico / Technician

Palabras clave: Polisacáridos, Quimiotaxonomía, Evolución de hongos, Pared celular

De los resultados acumulados a lo largo de las dos últimas décadas sobre la caracterización de los polisacáridos FISS (componente principal o único de la fracción soluble en agua de los extractos alcalinos de la pared de los hongos) podemos concluir que estas sustancias son excelentes caracteres para establecer relaciones taxonómicas y filogenéticas de los hongos. A estas conclusiones se ha llegado después de caracterizar la estructura del polisacárido FISS de más de 700 especies de hongos pertenecientes a unos 100 géneros representantes de varias familias y órdenes.

En los dos últimos años se han caracterizado los polisacáridos FISS de especies de los géneros *Nectria*, *Sesquicillium*, *Hypocrea*, *Arachniotus*, *Geosmithia*, *Verticillium*, *Dipodascus*, *Galactomyces*, *Cephalotheca* y *Apodus*. Estas estructuras permiten delimitar alguno de los géneros, pues todas las especies tienen un polisacárido semejante; los géneros *Geosmithia* y *Cephalotheca* son heterogéneos, ya que no todas las especies tienen el mismo polisacárido. Se han hecho dos revisiones sobre la utilización de los polisacáridos como caracteres taxonómicos a nivel de género (Recent Res. Dev. Microbiol. Vol 5, 235-248; Studies in Mycol. -en prensa-). Especies que pertenecen a un mismo género bien delimitado tienen un polisacárido semejante. También se encuentra el mismo polisacárido entre las especies de un teleomorfo y su correspondiente anamorfo. En géneros relacionados se observan variaciones en la estructura del

Keywords: Polysaccharides, Chemotaxonomy, Fungal evolution, Cell wall

FISS polysaccharides (main or unique component of the alkali-extractable and water soluble fraction of the fungal cell wall) are excellent taxonomic and phylogenetic characters. This conclusion is based on the accumulated results from this laboratory along the last two decades. During this time the structure has been determined of the polysaccharides from 700 species of fungi, from 100 genera belonging to various families and orders.

*In the last two years, FISS polysaccharides have been characterised from species of the genera *Nectria*, *Sesquicillium*, *Hypocrea*, *Arachniotus*, *Geosmithia*, *Verticillium*, *Dipodascus*, *Galactomyces*, *Cephalotheca* and *Apodus*. These structures allow the delimitation of some genera, since all their species have the same polysaccharide. The genera *Geosmithia* and *Cephalotheca* are heterogeneous, since all the species do not have a similar polysaccharide. The utilisation of the polysaccharides as taxonomic characters at the genus level has been the object of two revisions (Recent Res. Dev. Microbiol. Vol 5, 235-248; Studies in Mycol. -in press-). Species belonging to a well characterised genus have a similar polysaccharide. A similar polysaccharide is also found in the species of the teleomorph and its anamorph form genus. In related genera, variations are observed on the polysaccharides structures. These variations consist in changes in the linkage type between monomers or in the addition of different sugars. FISS polysaccharides evolution*

polisacárido, que consisten en cambios en el tipo de enlace entre monómeros o en la adición de un nuevo azúcar. La evolución de los polisacáridos F1SS, desde los homopolisacáridos de manosa encontrados en los Onygenales hasta los heteropolisacáridos de los Hypocreales ha sido objeto de otra publicación (*Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*). El esquema evolutivo de los polisacáridos se corresponde con ciertos esquemas tradicionales de la evolución de los hongos.

from mannose homopolysaccharides (Onygenales) to heteropolysaccharides (Hypocreales) has been the object of other publication. (Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry). The polysaccharides evolutive scheme parallels certain traditional fungal evolutive schemes.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- ALK-ABELLÓ, (1999-2003)
- DGICYT BQU-2000-1501-C02-01 (2000-2003)

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Ahrazem, O., Leal, J.A., Prieto, A., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2001) Chemical structure of a polysaccharide isolated from the cell wall of *Arachniotus verruculosus* and *Arachniotus ruber*. *Carbohydr. Res.* 336, 325-328.
- Ahrazem, O., Prieto, A., Gómez-Miranda, B., Bernabé, M., and Leal, J.A. (2001) Comparison of cell wall polysaccharides from *Nectria cinnabarina* with those from the group of *Nectria* with *Sesquicillium* anamorphs. *Microbiology* 147, 1839-1849.
- Leal, J.A., Prieto, A., Ahrazem, O., Pereyra, M.T., and Bernabé, M. (2001) cell wall polysaccharides: characters for fungal taxonomy and evolution. *Rec. Res. Devel. Microbiol.* 5, 235-248.
- Prieto, A., Leal, J.A., Gómez-Miranda, B., Ahrazem, O., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2001) Structure of a cell wall polysaccharide isolated from *Hypocrea gelatinosa*. *Carbohydr. Res.* 333, 173-178.
- Ahrazem, O., Blázquez, G., Prieto, A., Bernabé, M., and Leal, J.A. (2002) Polysaccharides F1SS: Chemotaxonomic and phylogenetic character for *Cephalotheca*. *Mycol. Res.* 106, 1187-1192.
- Ahrazem, O., Prieto, A., Leal, J.A., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2002) Fungal cell wall galactomannan isolated from *Geotrichum* spp. and their teleomorphs *Dipodascus* and *Galactomyces*. *Carbohydr. Res.* 337, 2347-2351.
- Ahrazem, O., Prieto, A., Leal, J.A., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé M. (2002) Fungal cell wall galactomannan isolated from *Apodus deciduus*. *Carbohydr. Res.* 337, 1503-1506.

- Bernabé, M., Ahrazem, O., Prieto, A., and Leal, J.A. (2002) Evolution of polysaccharides F1SS and proposal of their utilisation as antigen for rapid detection of fungal contaminants. *Electr. J. Environ. Agri. Food Chem.* 1, (1), <http://ejeafche.uvigo.es>
- Domenech, J., Prieto, A., Gómez-Miranda, B., Leal, J.A., Ahrazem, O., Jiménez-Barbero, J., and Bernabé, M. (2002) Structure of fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of three strains of *Verticillium fungicola*. *Carbohydr. Polym.* 50 (2), 209-212.
- Prieto, A., Ahrazem, O., Gómez-Miranda, B., Leal, J.A., and Bernabé, M. (2002) Cell wall polysaccharides (F1SS) disclose the relatedness of the genus *Geosmithia* with *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *Can. J. Bot.* 80, 410-415.
- Rupérez, P., Ahrazem, O., and Leal, J.A. (2002) Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus* *J. Agric. Food Chem.* 50, 840-845.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

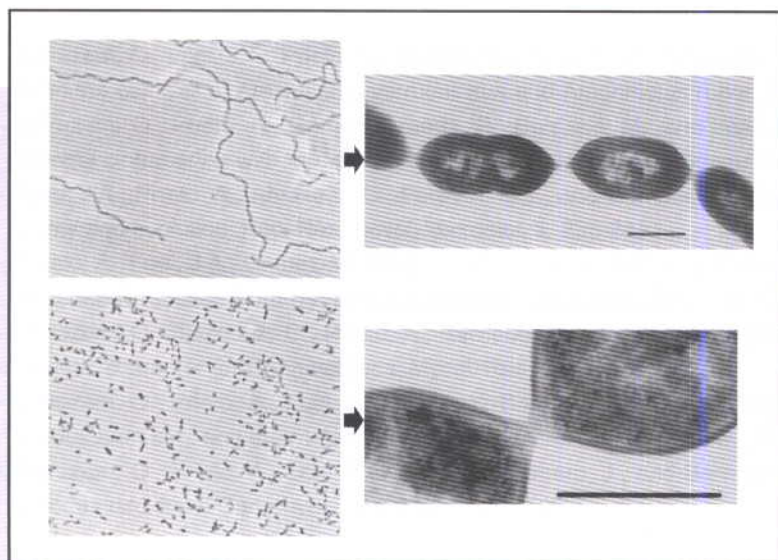
- Ahrazem, O., Prieto, A., Bernabé, M., and Leal, J.A. (2003) Polysaccharides F1SS: Evolutive and chemotaxonomic characters for *Plectomycetes*. *Stud. Mycol.* (en prensa/in press)
-

Genética Bacteriana *Bacterial Genetics*

RUBENS LÓPEZ GARCÍA
Jefe de Grupo/Group Leader
PEDRO GARCÍA GONZÁLEZ
ERNESTO GARCÍA LÓPEZ
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

BLANCA DE LAS RIVAS GONZÁLEZ DEL REY
VIRGINIA GARCÍA MARÍN (Desde VIII a XII-2001)
ANA GONZÁLEZ MORENO (Desde XI-2002)
DANIEL LLULL PEÑALBA (Hasta X-2001)
CRISTINA MOLDES TABARÉS
VIRGINIA OBREGÓN SÁNCHEZ (Hasta VII-2002)
PATRICIA ROMERO FERNÁNDEZ (Desde IX-2001)
B. Predoctorales / Graduate Students

ELOÍSA CANO CONGOSTO
MANUEL CARRASCO FERNÁNDEZ
Personal Técnico / Technicians



Palabras clave: Neumococo, Cápsula, Bacteriófagos, Enzimas líticas

Estudios moleculares de factores de patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae*: cápsulas, bacteriófagos y proteínas de unión a colina

Las aportaciones científicas de nuestro grupo en el bienio que se analiza en esta Memoria se resumen así:

a.- Es bien sabido que el polisacárido capsular de neumococo es el principal responsable de la virulencia de este patógeno humano. Durante el desarrollo de este proyecto se ha hiperproducido y caracterizado la Tts sintasa, enzima responsable de dirigir la síntesis del polisacárido capsular de tipo 37. Asimismo, se ha demostrado que la Tts sintasa posee una actividad bioquímica dual que conduce a la formación del polisacárido ramificado de tipo 37. Por otra parte, hemos analizado las bases genéticas y bioquímicas de la formación de las cápsulas polisacáridas en estreptococos patógenos.

b.- Nuestro trabajo sobre mureín-hidrolasas, enzimas presentes en todos los microorganismos bien diferenciados taxonómicamente, ha dado como resultado la caracterización de la primera endo- β -N-acetilglucosaminidasa, LytB, una mureín-hidrolasa que es fundamental para la separación de las células hijas al final de la división celular. Se ha sugerido la existencia de receptores específicos para LytB que están localizados en las regiones polares de la superficie de neumococo lo que facilitaría la hidrólisis localizada del peptidoglicano. Por otra parte, se ha conseguido la caracterización molecular de la fosforilcolín esterasa de *S. pneumoniae*, una enzima que parece estar implicada en regular la presencia de colina en las estructuras periféricas de este microorganismo. Finalmente, como resultado de nuestra colaboración con el grupo de los Drs. Antonio Romero y Guillermo Giménez, se ha conseguido cristalizar y determinar la estructura de la región C-terminal de la amidasa LytA implicada en el reconocimiento de sustratos conteniendo colina en su composición. Se estableció que se trata de una nueva estructura solenoide y se han estudiado las dinámicas del homopolímero activo que se forma.

c.- Se ha documentado en la literatura reciente la elevada presencia de fagos atemperados en aislados clínicos de *S. pneumoniae* (hasta en un 78% de tales aislados). Estas observaciones nos han llevado a proponer la conveniencia de analizar en deta-

Keywords: *Pneumococcus*, *Capsule*, *Bacteriophages*, *Lytic enzymes*

Molecular studies on virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*: capsules, bacteriophages, and choline-binding proteins

The main achievements of our work during the biennial period analyzed in this Memoire are summarized as follows:

a.- It is well known that capsular polysaccharides of pneumococcus are the main responsible for virulence of this important human pathogen. During the development of this project we have overexpressed and characterized the Tts synthase, the enzyme responsible to catalyze the synthesis of a high molecular weight polysaccharide identical to the type 37 capsule. Tts exhibits a dual biochemical activity that leads to the synthesis of the branched type 37 polysaccharide. On the other hand, we have analyzed the genetic and biochemical bases underlying the formation of polysaccharide capsules in streptococci.

b.- Murein-hydrolases are ubiquitous enzymes that have been identified in all well-characterized microorganisms. We have now reported the first endo- β -N-acetylglucosaminidase, LytB, a murein hydrolase whose gene has been cloned and expressed in *Escherichia coli*. This protein has turned out to be fundamental for daughter cell separation. We have proposed the existence of specific receptors for LytB that are positioned at the polar regions on the pneumococcal surface, allowing peptidoglycan hydrolysis and separation of the daughter cells, a process considered as basic for the spreading of the pathogenic species during infection. We have also done the molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase (Pce), an enzyme that appears to play an important role in the regulation of choline molecules located at the pneumococcal surface. Finally, as the result of a collaborative work with Drs. A. Romero and G. Giménez group, the first crystal structure of a choline-binding domain has been determined and revealed to be a novel solenoid fold consisting exclusively of β -hairpins. We have also studied new insights into the dynamics of the active homodimer of LytA.

c.- It has been documented in the recent literature the high incidence of lysogens in clinical strains of *S. pneumoniae* (up to 78%). This observation has alerted us on the importance of studying the molecular characteristics of temperate bacterioph-

lle las características moleculares de fagos atemperados de esta especie. Se ha completado la primera secuencia del genoma de un fago atemperado de neumococo (MM1), aislado de una estirpe multirresistente de serotipo 23F diseminada por varios continentes. Actualmente se están estudiando las funciones de varios de los genes identificados.

Neumococos atípicos: implicaciones clínicas y bases moleculares de sus características diferenciales

Durante los dos años de duración de esta memoria se han conseguido establecer las peculiaridades moleculares de los genes que codifican las amidasas LytA presentes en cepas próximas a neumococo que son resistentes a la lisis por la bilis (desoxicolato sódico). Las proteínas LytA obtenidas con este procedimiento mostraban una gran sensibilidad a desoxicolato sódico cuando se ensayaban frente a paredes celulares de neumococo. Asimismo, se han diseñado dos genes quiméricos que contienen las regiones codificantes para el dominio N- o el C-terminal de LytA de la cepa salvaje intercambiado con el C- o el N-terminal, respectivamente, de la enzima LytA de una cepa atípica. El análisis de las características bioquímicas de las enzimas expresadas a partir de estos genes quiméricos ha corroborado la influencia fundamental que ejerce un dominio C-terminal alterado a la hora de dar lugar a un fenotipo atípico. Hemos podido concluir que las cepas que presentan estas características representan un variado *pool* de organismos que están estrechamente relacionados con neumococo.

Desarrollo de nuevos sistemas para la producción de proteínas de fusión por fermentación

Se han desarrollado dos nuevos sistemas de expresión de proteínas de fusión basados en la utilización de dos dominios funcionales. El primero de ellos consiste en utilizar el dominio de unión a colina (ChBD) presente en algunas proteínas de la envuelta celular de neumococo, que permite la purificación de las proteínas de fusión en un único paso mediante cromatografía en DEAE-celulosa. Con el ChBD se han construido vectores para la producción de proteínas de fusión intracelulares o secretables en *E. coli*, que llevan insertada la secuencia codificante de reconocimiento de la trombina, tanto en posición N- como C-terminal, de forma que se puede purificar la proteína de interés

hages. We have now completed the entire nucleotide sequence of the genome of MM1, a phage that was isolated from a serotype 23F strain, an epidemic, multiresistant clone that has spread out by several continents. We are currently studying the functional mechanisms of several key genes identified in MM1 DNA.

Atypical pneumococci: Clinical consequences and molecular basis of their peculiar characteristics

The major goals during the two-year long period projected for this work are as follows:

We established the molecular peculiarities of the genes that code for the LytA amidases present in species close to S. pneumoniae. The proteins purified from recombinant Escherichia coli strains exhibited a noticeable sensitivity to sodium deoxycholate when they were tested on isolated pneumococcal cell walls using an in vitro assay. Furthermore, we have constructed, cloned and expressed in E. coli two functional chimeric enzymes built up by the N- or C-terminal domains of the wild type LytA amidase and the C- or N-terminal domains from an atypical LytA enzyme, respectively. The biochemical analysis of the enzymes purified from E. coli strains have confirmed and extended our observations on the fundamental role played by an altered C-terminal domain to determine the characteristic atypical phenotype. We have also concluded that the strains exhibiting this characteristic belong to species closely related to pneumococcus.

Developing of new systems for producing fusion proteins by fermentation

We have developed two new systems to express fusion proteins based on two functional domains. The first one utilizes the choline-binding domain (ChBD) present in some proteins of the pneumococcal cellular envelope, which allows the purification of the fusion proteins in a single step by using affinity chromatography on DEAE-cellulose. With such ChBD we have constructed vectors for producing intracellular or secretable fusion proteins in E. coli, harbouring the recognition sequence for trombine cleavage, both at N- or C-terminal position, allowing the purification of the protein of interest through digestion with this protease of the corresponding fusion protein. Moreover, we have constructed vectors for expression of fusion proteins in the

mediante digestión con esta proteasa de la proteína de fusión correspondiente. Asimismo se han construido vectores para la expresión de proteínas de fusión en la levadura *Pichia pastoris* donde el ChBD se coloca en posición N- o C-terminal. La versatilidad de estos plásmidos permitiría la localización de la proteína de interés tanto en el citoplasma como en el medio de cultivo. El segundo sistema es un nuevo método de fusión basado en el empleo de las fasin, proteínas que se pueden unir específicamente a los gránulos de bioplásticos (PHA) que producen de forma natural algunas bacterias como *Pseudomonas*. Estos gránulos de PHA se pueden separar mediante sencillas técnicas de centrifugación lo que podría permitir su desarrollo industrial a gran escala. Este proyecto se está realizando en colaboración con el grupo de Biotecnología Medioambiental.

yeast Pichia pastoris, where the ChBD is placed at N- or C-terminal position. Versatility of these plasmids would permit the localization of any protein in the cytoplasm or in the culture medium. The other system is a new method based on phasins, proteins capable to specifically bind to bioplastic granules (PHA) which are produced by some bacteria like Pseudomonas. These PHA granules can be separated using standard centrifugation techniques which would permit its scaling up at the industrial level. This project is being developed in collaboration with the group of Environmental Biotechnology.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MCyT, BCM (2000-2003)
- Fundación Ramón Areces (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Virginia Obregón Sánchez. Autolisinas y bacteriófagos como factores de atipicidad en *Streptococcus pneumoniae*. Universidad Complutense de Madrid, 2002. Directores: Drs. P. García y J.L. García.
- Blanca de las Rivas González del Rey. Aislamiento y caracterización de nuevas proteínas de unión a colina de *Streptococcus pneumoniae*. Universidad Complutense de Madrid, 2002. Directores: Drs. P. García y R. López.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Bergé, M., García, P., Iannelli, F., Prère, M.F., Granadel, C., Polissi, A., and Claverys, J.P. (2001) The puzzle of *zmpB* and extensive chain formation, autolysis defect and non-translocation of choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 39, 1651-1660.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2001) Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb. Drug Res.* 7, 213-222.

- Dopazo, J., Mendoza, A., Herrero, J., Caldara, F., Humbert, Y., Friedli, L., Guerrier, M., Grand-Schenk, E., Gandin, C., de Francesco, M., Polissi, A., Buell, G., Feger, G., García, E., Peitsch, M., and García Bustos, J.F. (2001) Annotated draft genomic sequence from a *Streptococcus pneumoniae* type 19F clinical isolate. *Microb. Drug Resist.* 7, 99–125.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2001) A novel solenoid fold in the cell anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nature Struct. Biol.* 8, 1020-1024.
- Llull, D., García, E., and López, R. (2001) Tts, a processive β -glucosyltransferase of *Streptococcus pneumoniae*, directs the synthesis of the branched type 37 capsular polysaccharide in pneumococcus and other gram-positive species. *J. Biol. Chem.* 276, 21053-21061.
- Llull, D., López, R., and García, E. (2001) Genetic basis and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci. *Curr. Mol. Med.* 1, 475-491.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2002) Purification and polar localization of the pneumococcal LytB, a putative endo- β -N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* 184, 4988-5000.
- Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2002) Two new crystal forms of the choline-binding domain of the mayor pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J. Mol. Biol.* 321, 163-173.
- García E. y López, R. (2002) Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Rev. Esp. Quimiot.* 15, 306-312.
- Monterroso, B., Albert, A., Martínez-Ripoll, M., García, P., García, J.L., Menéndez, M., and Hermoso, J.A. (2002) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the complete modular endolysin from Cp-1, a phage infecting *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Cryst. D* 58, 1487-1489.
- Obregón, V., García, P., García, E., Fenoll, A., López, R., and García, J.L. (2002) Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile-insoluble. *J. Clin. Microbiol.* 7, 2545-2554.
- Saiz, J.L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Varea, J., Arrondo, J.L., Lloro, I., García, J.L., Laynez, J., and Menéndez, M. (2002) Characterization of Ejl, the cell-wall amidase coded by the pneumococcal bacteriophage Ejl-1. *Protein Sci.* 11, 1788-99.

Contribuciones a Libros/Contributions to Books

- Guerrero, R. y López, R. (2002) La(s) revista(s) científicas de la SEM. El tesón de lo improbable. Historia de la Sociedad Española de Microbiología a lo largo del siglo XX. Ed.: Fundación Ramón Areces. Madrid, pp. 143-181.

Patentes/ Patents

- Prieto Jiménez, M. A., Moldes Tabarés, C., García González, P. y García López, J.L. (2001) Proteínas de fusión inmovilizadas en gránulos de polihidroxialcanoato de cadena media. Patente Española 200102240.
-

Biotecnología Medioambiental *Environmental Biotechnology*

JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ
Jefe de Grupo/Group Leader
EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

MANUEL CARMONA PÉREZ
M^a JOSÉ HERNÁNDEZ SILVA (Hasta XII-01)
BALTASAR MIÑAMBRES RODRÍGUEZ
M^a AUXILIADORA PRIETO JIMÉNEZ
Investigadores Contratados / Research Associates

NICOLÁS J. MARIE SIERRO (Desde I-01 a III-01)
Investigadores Visitantes / Visiting Scientists

SERGIO ALONSO UTRILLA (Desde VII-02)
BEATRIZ GALÁN SICILIA
BEGOÑA TORRES BELINCHÓN (Hasta VII-02)
M^a TERESA ZAMARRO MOLINA (Desde XI-01)
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

M^a JOSÉ LÓPEZ BARRAGÁN
CRISTINA FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
JOSÉ IGNACIO JIMÉNEZ ZARCO (Desde X-01)
B. Predoctorales / Graduate Students

M^a EDITH CALVO ALAGUERO (Desde I-02)
Personal Técnico Contratado / Technician



Palabras clave: Biodegradación, Compuestos aromáticos, Contención, Bioplásticos, Catabolismo anaeróbico

Caracterización de rutas catabólicas de compuestos aromáticos en *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*

Durante los dos años que abarca la presente Memoria, se han estudiado los mecanismos moleculares que controlan la expresión de los genes responsables del catabolismo del ácido 3- y 4-hidroxifenilacético (*hpa*) y 3-hidroxifenilpropiónico

Keywords: Biodegradation, Aromatic compounds, Containment, Bioplastics, Anaerobic catabolism

Characterization of aromatic catabolic pathways in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*

During the biennial period recorded by this Memoir we have studied the molecular mechanisms controlling the expression of the genes responsible for the catabolism of 3- and 4-hydroxyphenylacetic acid (*hpa*), and 3-hydroxyphenylpropionic acid

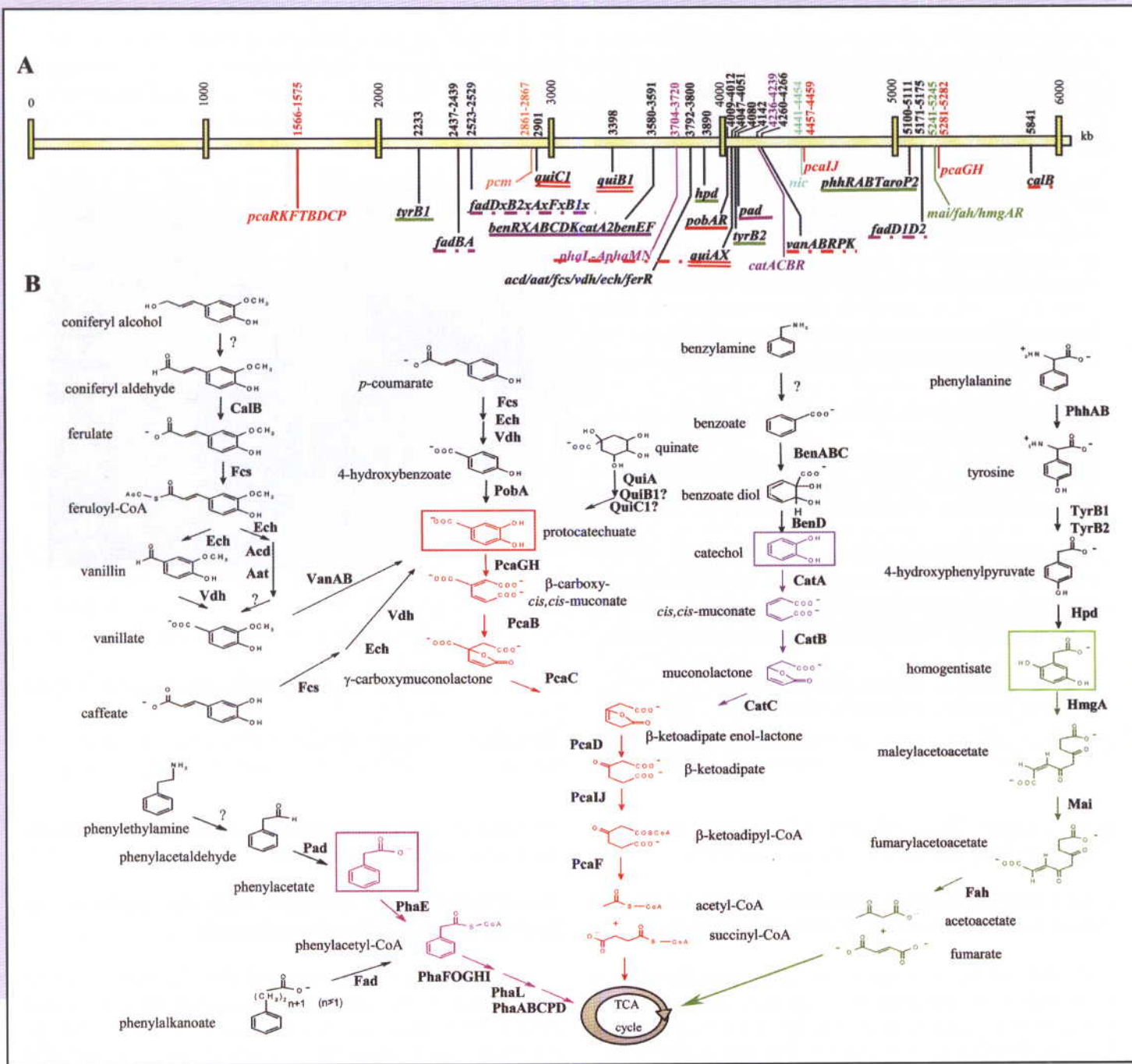


Figura 2: Rutas catabólicas de compuestos aromáticos en *Pseudomonas putida*. A. Localización en el genoma de *P. putida* de los genes y clusters génicos responsables de la degradación de compuestos aromáticos. B. Bioquímica de las rutas catabólicas.

Figure 2: Aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida*. A. Location of the genes and gene clusters encoding the aromatic catabolic pathways on the complete *P. putida* genome. B. Biochemical steps for the catabolism of aromatic compounds.

(*mhp*) en *Escherichia coli*. Se han caracterizado las interacciones de las proteínas reguladoras HpaR (represor), y MhpR (activador) con los correspondientes promotores regulados, *Pg* y *Pa*, y se ha analizado el perfil de inductores en cada caso. Además de la regulación específica de cada ruta, existe una regulación sobrepuesta que está mediada por reguladores globales de *E. coli* tales como la proteína IHF (factor de integración del huésped) y CRP (proteína receptora de cAMP), y que permite ajustar la transcripción de los genes catabólicos al estado fisiológico y a las fuentes de carbono (efecto de represión por glucosa) disponibles para las células en cada momento. Se ha caracterizado también un transportador de 3-hidroxifenilpropiónico, la proteína MhpT, que permite la inducción de los genes *mhp* a bajas concentraciones de dicho aromático. Por lo que respecta a los aspectos bioquímicos del catabolismo de compuestos aromáticos en *E. coli*, se ha identificado la oxigenasa multicomponente PaaABCDE que hidroxila fenilacetil-CoA durante la segunda etapa de degradación de fenilacetato a través de una peculiar ruta híbrida que es dependiente de oxígeno no sólo para la actividad oxigenasa antes mencionada sino también para la expresión de los genes *paa*.

Algunas cepas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* son capaces de degradar 3-hidroxibenzoato a través de la ruta central del gentisato. Se han clonado y caracterizado los genes de *S. typhimurium* responsables de la mineralización del 3-hidroxibenzoato (*mhb-dhb*) y se ha estudiado el activador transcripcional (*DhbR*) que controla su expresión.

En *Pseudomonas putida* se han identificado los clusters génicos responsables de las rutas centrales de degradación de catecol (*cat*), protocatecuato (*pca*), homogentisato (*hmg/fah/mai*), y fenilacetato (*pha*). Distintos aspectos del catabolismo y regulación transcripcional de la ruta del homogentisato se han estudiado en detalle, y dicha ruta se ha clonado y utilizado para ampliar la capacidad catabólica de *E. coli* frente a los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina.

(*mhp*). The interactions between the regulatory proteins HpaR (repressor) and MhpR (activator) with their cognate promoters, *Pg* and *Pa*, have been characterized, and the effector profile of each regulator was determined. Superimposed to the specific regulation, some global regulators such as the IHF (integration host factor) and CRP (cAMP receptor protein) proteins mediate a higher level of regulation that adjusts the transcriptional output from the catabolic promoters to the overall growth status of the cell and to the available carbon sources. A specific transport protein (MhpT) for the uptake of 3-hydroxyphenylpropionic acid has been also characterized and it allows induction of the *mhp* genes at low concentrations of such aromatic compound. From a biochemical point of view, we have identified the PaaABCDE multicomponent oxygenase that hydroxylates phenylacetyl-CoA during the second enzymatic step in the phenylacetic acid catabolic pathway. Such hybrid pathway requires oxygen not only for the activity of the multicomponent oxygenase but also for the expression of the *paa* genes.

Some *E. coli* and *Salmonella typhimurium* strains are able to degrade 3-hydroxybenzoate via gentisate. We have cloned and characterized the genes from *S. typhimurium* responsible for the complete degradation of 3-hydroxybenzoate (*mhb-dhb*) and we have studied the transcriptional activator (*DhbR*) controlling the expression of such genes.

Regarding to the degradation of aromatic compounds in *Pseudomonas putida*, we have identified the gene clusters encoding the central pathways responsible for the degradation of catechol (*cat*), protocatechuate (*pca*), homogentisate (*hmg/fah/mai*), and phenylacetate (*pha*). The catabolism and transcriptional regulation of the homogentisate pathway have been studied, and this pathway has been cloned and expressed in *E. coli* to expand the catabolic abilities of this bacterium towards aromatic amino acids (phenylalanine and tyrosine). Moreover, we have identified the peripheral pathways for degradation of *p*-hydroxybenzoate (*pob*), benzoate (*ben*), quinate

Además, se han identificado las rutas periféricas para el catabolismo de p-hidroxibenzoato (*pob*), benzoato (*ben*), quinato (*qui*), compuestos fenilpropenoicos tales como los ácidos ferúlico, cumárico, cafeico y vanílico (*fcs*, *ech*, *vdh*, *cal*, *van*, *acd*, y *acs*), aminoácidos fenilalanina y tirosina (*phh*, *hpd*), y ácidos fenilalcanoicos (*fad*). Una nueva ruta central para la degradación de heterociclos aromáticos (cluster *nic*) está siendo caracterizada y utilizada para la transformación del ácido nicotínico a ácido 6-hidroxinicotínico, un importante precursor en la industria farmacéutica.

Se han construido cassettes de DNA con los genes *sty* de *Pseudomonas* sp. Y2 responsables de la transformación de estireno a fenilacetato. Estas cassettes se han utilizado para expandir la capacidad catabólica de otros organismos generándose distintas cepas de *Pseudomonas* capaces de combinar el catabolismo del estireno con la degradación de otros compuestos tóxicos tales como mezclas BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno).

Biodesulfuración de petróleo

Para combatir el grave problema de la lluvia ácida ocasionado, en gran medida, por la oxidación del azufre presente en los combustibles fósiles, se requiere una reducción significativa en su contenido en azufre orgánico. Una estrategia alternativa al proceso químico de hidrodesulfuración es la utilización de microorganismos capaces de eliminar selectivamente el azufre orgánico del crudo (biodesulfuración). Nuestro grupo ha desarrollado cepas recombinantes de *P. putida* portadoras de los genes *dsz* de *Rhodococcus* sp. IGTS8 responsables de la desulfuración de dibenzotiofeno (DBT), y que son capaces, tanto en crecimiento como en estado de reposo, de eliminar selectivamente el azufre del DBT. Para mejorar la eficacia de estos biocatalizadores, durante este bienio hemos estudiado dos de los cuellos de botella del proceso: i) el papel de la última enzima de la ruta *Dsz* (desulfinasas *DszB*) como etapa limitante del mecanismo de desulfuración, y ii) la posibilidad de eliminar uno de los productos finales del proceso (2-hidroxibifenilo) mediante la clonación y expresión de los genes *hbp* de *Pseudomonas azelaica* responsables de la degradación de este importante tóxico. Una nueva generación de *Pseudomonas*

(*qui*), phenylpropenoid compounds such as ferulic, coumaric, caffeic and vanillic acids (*fcs*, *ech*, *vdh*, *cal*, *van*, *acd*, and *acs*), phenylalanine and tyrosine (*phh*, *hpd*), and phenylalkanoic acids (*fad*). A new central pathway for the catabolism of heterocyclic aromatic compounds (cluster *nic*) is being characterized and used to transform nicotinic acid to 6-hydroxynicotinic acid, a high added value intermediate in the pharmaceutical industry.

We have engineered DNA cassettes harboring the *sty* genes from *Pseudomonas* sp. Y2 which are responsible of the conversion of styrene into phenylacetic acid. These cassettes have been used to expand the catabolic abilities of other organisms, generating different *Pseudomonas* strains that combine styrene removal with degradation of other toxic compounds such as BTEX mixtures (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene).

Biodesulfurization of oil

The acid rain is an environmental problem caused, mainly, by the oxidation of the sulfur present in fossil fuels. To limit the sulfur-related air pollution, environmental restrictions on the sulfur content of fossil fuels are increasingly stringent. An alternative strategy to the conventional hydrodesulfurization process (chemical process) is the utilization of microorganisms able to selectively remove the organic sulfur present in oil (biodesulfurization). We have engineered *P. putida* recombinant strains that harbour the *dsz* genes from *Rhodococcus* sp. IGTS8 responsible for dibenzothiophene (DBT) desulfurization, and they are able, both in growing and in resting cells conditions, to selectively remove the sulfur atom from DBT. To improve the efficiency of the biodesulfurizers, during this biennial period we have addressed two bottlenecks of the desulfurization pathway: i) the role of the last enzyme (*DszB* desulfinase) as the limiting step of the *Dsz* pathway, and ii) the removal of one of the final products of the pathway (2-hydroxybiphenyl) through the cloning and expression of the *hbp* genes from *Pseudomonas azelaica*. A new generation of recombinant *Pseudomonas* biodesulfurizers is being developed.

Bioplastics

Bioplastics or polyhydroxyalkanoates (PHA) are bacterial storage compounds that are synthesized and accumulated intra-

recombinantes más eficaces en desulfuración está siendo desarrollada.

Bioplásticos

Los polímeros conocidos como bioplásticos o polihidroxialcanoatos (PHA) son producidos y acumulados en forma de gránulos de reserva en el interior celular de ciertas bacterias cuando las condiciones de cultivo no son óptimas para el crecimiento. En general, los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster biodegradable (93-97% del peso seco del gránulo (PSG)) rodeado por una monocapa fosfolipídica (1-6% del PSG) y proteínas asociadas al gránulo (GAPs) (1-2% del PSG), las cuales forman una fina capa en su superficie. Las fasininas, componente principal de las GAPs, han sido identificadas en varios microorganismos y se cree que forman una capa proteica en la superficie del gránulo, generando una interfase entre el citoplasma celular (ambiente hidrofílico) y el núcleo hidrofóbico del gránulo de PHA. Además de esta función estructural, algunas fasininas poseen otras funciones relacionadas con la biosíntesis del PHA. *Pseudomonas putida* produce mayoritariamente dos proteínas asociadas al gránulo de PHA, las fasininas PhaF y PhaI. Del análisis de la secuencia de aminoácidos de la fasinina PhaF se deduce que esta proteína está estructurada en dos dominios: la región C-terminal, similar a la proteína de tipo histona, y el extremo N-terminal, que presenta 57% de similitud con la secuencia de aminoácidos completa de la fasinina PhaI (15,4 kDa) y es el responsable de la unión al gránulo. El dominio N-terminal de PhaF se ha utilizado como polipéptido de afinidad (BioF) para construir fusiones de proteínas con actividad enzimática o de interés industrial sin que por ello pierdan la capacidad de unión al gránulo. La posibilidad de separar los gránulos de PHA mediante sencillas técnicas de centrifugación, ya puestas a punto para la producción industrial de bioplásticos, hace que este sistema sea ideal para su desarrollo a gran escala. Este proyecto se está realizando en colaboración con el grupo de Genética Bacteriana.

Bioseguridad

La liberación de organismos manipulados genéticamente al medio ambiente para la eliminación de contaminantes ocasiona-

*cellularly in the form of inclusion bodies (granules) when the bacteria face non-optimal growth conditions. The PHA granules consist of a biodegradable polyester (93-97% of the granule dry weight) surrounded by a monolayer of phospholipids (1-6% of the granule dry weight) and some granule associated proteins (GAPs) that amount up to 1-2% of the granule dry weight. Phasins, major component of the GAPs, have been identified in several microorganisms and they are thought to cover the surface of the granule becoming an interphase between the cytoplasm (hydrophilic) and the hydrophobic core of the granule. In addition to the structural role of phasins, some of them are involved in PHA biosynthesis. *Pseudomonas putida* produces two major GAPs, the PhaF and PhaI phasins. The PhaF protein consists of two domains, the C-terminal domain that shows similarity with histone-like proteins, and the N-terminal domain, which shows 57% similarity with the complete PhaI protein (15.4 kDa), that mediates binding of the protein to the granule. The N-terminal domain of the PhaF protein has been successfully used as a polypeptide tag (BioF) for generating fusion proteins with enzymatic activity that retain the ability to bind to the PHA granule. Since PHA granules are easily purified by centrifugation, this experimental approach becomes an interesting strategy for large scale protein purification. This project is being developed in collaboration with the group of Bacterial Genetics.*

Biosafety

The release of recombinant organisms to the open field for removal of contaminants (bioremediation) raises serious public concerns. Two main concerns are how recombinant DNA can spread among indigenous bacterial populations and how the recombinant organism can be removed from the field once it has finished the programmed task. The current systems for biological containment (programmed cell cycle) and gene containment (barriers to DNA dispersal) of recombinant bacteria are based on complex regulatory circuits that control the expression of a lethal function. To increase the efficiency of containment we have combined within the same system two different lethal functions (colicin E3 RNase and EcoRI restriction endonuclease) under control of different regulatory elements to reduce the appearance of mutant cells that survive to the toxic effect of the lethal element. The lethal genes have been expressed constituti-

na ciertos temores en la sociedad por los posibles riesgos de transferencia del DNA recombinante a la población indígena de organismos y por la posible diseminación de los organismos recombinantes a lugares donde no se desea su presencia o su permanencia en el lugar de interés cuando el tóxico ya ha sido eliminado. Los sistemas actuales de contención biológica (supervivencia programada) y genética (barreras a la dispersión horizontal del DNA) en bacterias recombinantes están basados en complejos circuitos de regulación acoplados a la expresión de una función letal. Para mejorar la eficacia de dichos sistemas hemos procedido a combinar dos funciones letales distintas (la colicina E3, una RNasa, y la endonucleasa de restricción *EcoRI*) bajo regulaciones distintas en el mismo sistema de contención con la idea de reducir la aparición de mutantes que se escapan al efecto tóxico del elemento letal. El control de la expresión de los genes letales se ha diseñado utilizando promotores constitutivos y el correspondiente antídoto (proteína de inmunidad E3 y metilasa *EcoRI*) para contención genética, o promotores/reguladores que responden a la presencia/ausencia del compuesto que se pretende degradar para contención biológica. La combinación de funciones letales se ha demostrado como una estrategia válida para incrementar la bioseguridad de los microorganismos recombinantes.

Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos.

Durante este bienio hemos iniciado una nueva línea de investigación basada en el estudio del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en bacterias anaerobias facultativas. Para ello hemos escogido como sistema modelo la degradación de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. cultivado en condiciones desnitrificantes. Hemos aislado y caracterizado taxonómicamente mediante secuenciación del 16S rDNA la cepa *Azoarcus* sp. CIB (CECT 5669). La cepa CIB es capaz de utilizar una serie de compuestos aromáticos tales como tolueno, m-xileno, benzoato, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, bencilamina, fenilacetato, 4-hidroxifenilacetato, 3-hidroxifenilpropionato, tropato, fenilalanina y tirosina, como única fuente de carbono y energía en condiciones desnitrificantes. Los genes responsables de la ruta central de degradación anaeróbica de benzoato (ruta del benzoil-CoA) en *Azoarcus* sp. CIB se han clonado y secuenciado, representando los primeros que se caracterizan en bacterias del género *Azoarcus*. El cluster *bzd*

vely in the presence of the cognate antidotes (the immunity E3 protein and the EcoRI methylase) for gene containment. A promoter/regulator couple that responds to the presence/absence of the pollutant intended to be degraded is the control element of the lethal genes in a biological containment system. The dual lethal system becomes a successful strategy to enhance biosafety of recombinant microorganisms.

Anaerobic catabolism of aromatic compounds

*During this biennial period we have started a new line of research based on the study of the anaerobic catabolism of aromatic compounds by facultative anaerobic bacteria. We have chosen the degradation of aromatics in *Azoarcus* sp. grown under denitrifying conditions as a model system. We have isolated and characterized by 16S rDNA sequencing the strain *Azoarcus* sp. CIB (CECT 5669). *Azoarcus* sp. CIB is able to use several aromatic compounds such as toluene, m-xylene, benzoate, 3-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate, benzylamine, phenylacetate, 4-hydroxyphenylacetate, 3-hydroxyphenylpropionate, tropate, phenylalanine and tyrosine, as sole carbon and energy source under denitrifying conditions. The genes responsible for the central pathway of anaerobic benzoate degradation (benzoyl-CoA pathway) in *Azoarcus* sp. CIB have been cloned and sequenced, and they constitute the first ones to be characterized within the genus *Azoarcus*. The *bzd* cluster (19 kb) contains 14 catabolic genes that appear to constitute an operon, as well as a regulatory gene (*bzdR*) that controls the expression of the catabolic genes. The first enzymatic step of the *Bzd* pathway is encoded by the last gene of the catabolic operon (*bzdA*) and it is mediated by a benzoyl-CoA ligase (*BzdA*) that activates benzoate to benzoyl-CoA. The *bzdA* gene has been cloned and overexpressed in *E. coli* and the ligase activity has been characterized. The second enzymatic step of the *Bzd* pathway is carried out by a benzoyl-CoA reductase (*BzdNOPQM*), which is a strict anaerobic enzyme complex. The *BzdR* protein shows a primary structure that has not been yet described in prokaryotes and, therefore, it constitutes the first member of a new family of transcriptional regulators. Overimposed to the *Bzd*-mediated specific regulation, there is a global regulation that leads to catabolite repression effects.*

Within a collaborative project with a German research team

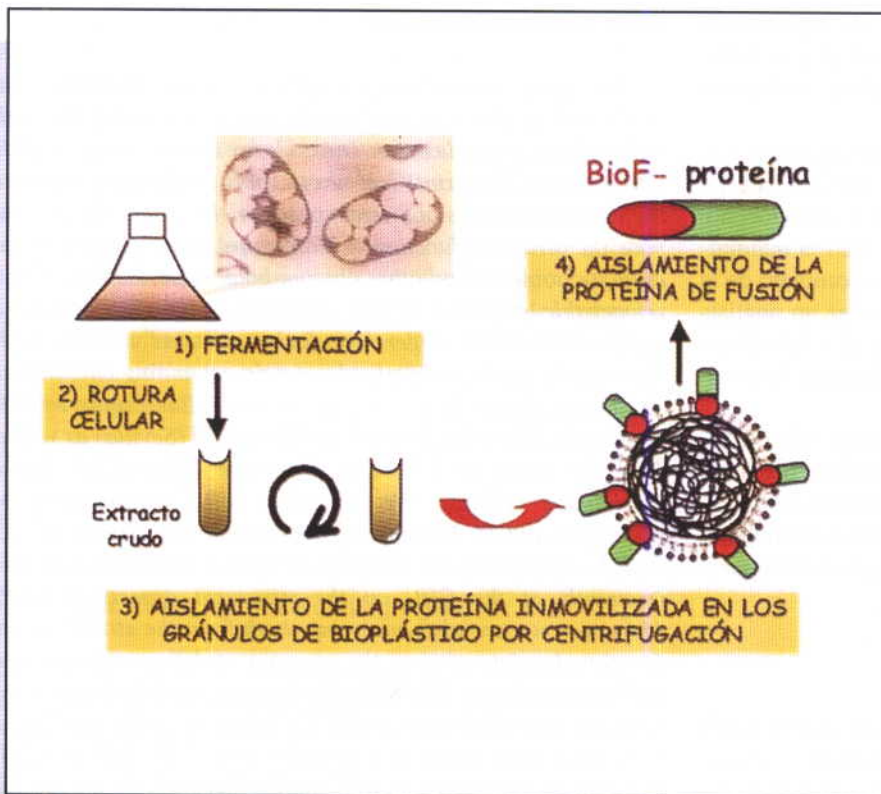


Figura 1: Esquema del protocolo de inmovilización/purificación de la fusión BioF-proteína. Este sencillo método permite la inmovilización selectiva de las proteínas de fusión en un polímero biodegradable (gránulo de PHA) a medida que son sintetizadas en la célula recombinante. Asimismo, es posible la purificación de proteína soluble una vez liberada del gránulo de bioplástico tras un tratamiento suave con un detergente.

Figure 1: Scheme of the designed protocol for immobilization/purification of fused BioF-proteins. This simple procedure permits to selectively immobilize recombinant fusion proteins onto a biodegradable polymer (PHA granule) simultaneously to their biosynthesis in the bacterial cell. Additionally, a purified soluble protein can be produced after releasing it from the bioplastic granule by a mild detergent treatment.

(19 kb) consiste en al menos 14 genes catabólicos que parecen constituir un único operón y un gen regulador (*bzdR*) que controla la expresión de los primeros. La primera actividad enzimática de la ruta Bzd está codificada por el último de los genes catabólicos (*bzdA*) y consiste en la activación del benzoato a benzoil-CoA mediante una benzoil-CoA ligasa (BzdA). El gen *bzdA* se ha clonado e hiperexpresado en *E. coli* y se ha caracterizado bioquímicamente dicha actividad enzimática. La segunda actividad enzimática de la ruta Bzd, benzoil-CoA reductasa (BzdNOPQM), es estrictamente dependiente de la ausencia de oxígeno y también ha podido ser ensayada en la cepa CIB. La proteína BzdR presenta una estructura primaria que no se ha descrito hasta la fecha en procariontes y constituye

that is sequencing the genome of *Azoarcus* sp. EbN1, a strain that degrades toluene and ethylbenzene under anoxic conditions, we are developing genetic tools to manipulate such bacterium. The complete genome of strain EbN1 will allow us to accomplish for the first time a global analysis of the gene clusters involved in the anaerobic catabolism of aromatic compounds in a denitrifier microorganism.

Recently, we have identified several *Pseudomonas* strains that are able to utilize benzoate as sole carbon and energy source under anaerobic conditions. The molecular characterization of the benzoate degradation pathway in such *Pseudomonas* strains will provide relevant information on the evolution of the anaerobic aromatic catabolic pathways in denitrifiers.

así el primer miembro de una nueva familia de reguladores transcripcionales. A la regulación específica mediada por BzdR se superpone una regulación global que implica fenómenos de represión catabólica.

En colaboración con un consorcio de grupos alemanes que están secuenciando el genoma de *Azoarcus* sp. EbN1, una cepa capaz de degradar anaeróbicamente tolueno y etilbenceno, estamos desarrollando herramientas genéticas para la manipulación de este organismo. Disponer del genoma completo de la cepa EbN1 nos permitirá realizar por primera vez un análisis global de los clusters génicos involucrados en el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en una bacteria desnitrificante.

Recientemente hemos identificado en nuestro laboratorio ciertas cepas de *Pseudomonas* capaces de utilizar benzoato como única fuente de carbono y energía en ausencia de oxígeno. Su estudio revelará importantes datos sobre la evolución molecular de las rutas de catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en bacterias desnitrificantes.

Otros proyectos en colaboración

El grupo desarrolla distintos proyectos de colaboración tanto de investigación básica como aplicada con otros grupos del CIB, la Universidad y la empresa. Entre los primeros hay que destacar la colaboración con el grupo de Genética Bacteriana del CIB con el que se desarrollan desde hace muchos años estudios moleculares sobre factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*. Fundamentalmente se están estudiando las relaciones estructura-función de las autolisinas de neumococo y de otras proteínas que tienen capacidad de unión a colina (choline-binding proteins, CBPs). Un aspecto interesante de este trabajo es el desarrollo de vectores de expresión de proteínas de fusión con las CBPs las cuales permiten una fácil purificación de la fusión por su capacidad de unirse a matrices que contengan colina o moléculas análogas. En esta línea de trabajo se colabora con las empresas Biotoools (Madrid) y Biomedal (Sevilla) y con el grupo de J.M. Sanz de la Universidad Miguel Hernández (Elche). En el estudio de los aspectos estructurales de las CBPs y otras proteínas también se colabora con los grupos de M. Menéndez y de M. Martínez del Instituto Rocasolano (CSIC) y de J. Jiménez del Instituto de Química Orgánica (CSIC) (actualmente en el CIB). Por otro

Other collaborative projects

The group is developing different collaborative projects of basic and applied research with other groups of the CIB, Universities and industries. Thus, we are collaborating with the CIB group of Bacterial Genetics to study at the molecular level the virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. We are studying the structure-function relationships of the pneumococcal autolytic proteins and other choline-binding proteins (CBPs). A remarkable objective of this research is the development of expression vectors to generate fusion proteins with the CBPs that can be easily purified on a matrix containing choline or a choline analogue. In this activity we are collaborating with the companies Biotoools (Madrid) and Biomedal (Sevilla) as well as with the group of J.M. Sanz from the Universidad Miguel Hernández (Elche). We are also collaborating with M. Menéndez and M. Martínez of the Instituto Rocasolano (CSIC) and J. Jiménez of the Instituto de Química Orgánica (CSIC) (currently at the CIB) on the structural aspects of CBPs. Moreover, we are also analyzing, both from the structural and functional points of view, the genomes of different pneumococcal bacteriophages. Regarding to the most applied research projects, we are collaborating with A. Carrascosa of the Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) and J. M. Guisán of the Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC) on the production and immobilization of beta- and alpha-galactosidases from *Thermus* sp. In addition, we are collaborating with INBIOTEC (León) and the company Antibióticos S.A. (León) on the overproduction of industrial enzymes, such as the bacterial beta-lactam acylases and the D-amino acid oxidases of yeast, used for the semisynthesis of beta-lactam antibiotics.

lado, dentro de los estudios sobre neumococo se están analizando los genomas de distintos bacteriófagos tanto desde el punto de vista estructural como funcional. Entre los proyectos más aplicados, se está colaborando con el grupo de A. Carrascosa del Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) y con el grupo de J. M. Guisán del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC) en la producción e inmovilización de beta- y alfa-galactosidasas de *Thermus* sp. También se colabora con INBIOTEC (León) y con la empresa Antibióticos S.A. (León) en la hiperproducción de enzimas industriales como las beta-lactam-acilasas bacterianas y las D-aminoácido oxidasas de levaduras utilizadas para la obtención de antibióticos beta-lactámicos semisintéticos.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, 2FD97-1326-C03-02 (2000-2001)
- CICYT, 2FD97-1842 (2000-2001)
- Repsol YPF (2000-2001)
- CAM, 07M/0127/2000 (2000-2002)
- Fundación Ramón Areces, FRA-XICN-BT (2000-2003)
- EU, QLK3-2000-00170 (2000-2003)
- CICYT, BIO2000-1076 (2000-2003)
- CAM, Contrato Programa Grupos Estratégicos (2000-2004)
- CICYT, BCM2000- 0125-CO4-02 (2001-2003)
- CICYT, BMC2000-1002 (2001-2003)
- CICYT, BIO2000-0009-P4-04 (2002-2004)
- CICYT, BIO2000-0060-P4-03 (2002-2004)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Beatriz Galán Sicilia. Estudio del sistema regulador del operón meta de la ruta de degradación del ácido 4-hidroxifenilacético en *Escherichia coli*. Universidad Complutense de Madrid, 2002. Directores: Drs. M^º.-A. Prieto y J.L. García.
- Begoña Torres Belinchón. Estudio de la regulación de la ruta de degradación del ácido 3-hidroxifenilpropiónico en *Escherichia coli* y sus aplicaciones para el desarrollo de nuevos sistemas de contención activa de microorganismos. Universidad Autónoma de Madrid, 2002. Directores: Drs. E. Díaz y J.L. García.

- Virginia Obregón Sánchez. Autolisinas y bacteriófagos como factores de atipicidad en *Streptococcus pneumoniae*. Universidad Complutense de Madrid, 2002. Directores: Drs. P. García y J.L. García.
- Juana Marieta Bernedo Cornejo. Inmovilización de glutamato racemasa genéticamente modificada para la producción de mezcla racémica D-L glutámico. Universidad de Alcalá de Henares, 2002. Directores: Drs. E. García-Calvo, J.M. Guisán y J.L. García.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Abraham, G.A., Gallardo, A., San Román, J., Olivera, E., Jodrá, R., García, B., Miñambres, B., García J.L., and Luengo, J.M. (2001) Microbial synthesis of poly(β -hydroxyalkanoates) bearing phenyl groups from *Pseudomonas putida*: chemical structure and characterization. *Biomacromol.* 2, 562-567.
- De Las Rivas, B., García, J.L., García, P., and López, R. (2001) Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphocholine esterase (Pce). *Microbiol. Drug Resist.* 7, 213-222. 148.
- Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, M.A., and García, J.L. (2001) Catabolism of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 523-569.
- Fernández-Lafuente, R., Hernández-Justiz, O., Terreni, M., Alonso, J., García, J.L., Moreno, M. A., and Guisán, J. M. (2001) High yield synthesis of ampicillin catalyzed by stabilized derivatives of a tetrameric enzyme (α -amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans* in a fed-batch reactor. *Biomacromolecules* 2, 95-104.
- Fernández-Lafuente, R., Hernández-Justiz, O., Mateo, C. Terreni, M., Alonso, J., García-López, J.L., Moreno, M. A., and Guisán, J.M. (2001) Stabilization of a tetrameric enzyme (α -amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans*) enables a very improved performance of ampicillin synthesis. *J. Mol. Cat. B11*, 633-638.
- Fernández-Lafuente, R., Hernández-Jústiz, O., Mateo, C., Terreni, M., Fernández-Lorente, G., Moreno, M.A., Alonso, J., García-López, J.L., and Guisán, J.M. (2001) Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: Stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin synthesis under dissociation conditions. *Biomacromolecules* 2, 95-104.
- Fernández-Lorente, G., Cortés, E., García, J.L., Fernández-Lafuente, R., and Guisán, J.M. (2001) One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-His-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports. *Biotechnol. Bioeng.* 76, 269-276.
- Galán, B., Kolb, A., García, J.L., and Prieto, M.A. (2001) Superimposed levels of regulation of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 37060-37068.
- Jung, K., Hazenberg, W., Prieto, M.A., and Witholt, B. (2001) Two-Stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates). *Biotechnol. Bioeng.* 72, 19-24.
- Kessler, B., Ren; Q., de Roo, G., Prieto, M.A., and Witholt, B. (2001) Engineering of biological systems for the synthesis of tailor-made polyhydroxyalkanoates, a class of versatile polymers. *Chimia.* 55, 119-123.
- Ladero, M., Santos, A., García, J.L., and García-Ochoa, F. (2001) Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: kinetic modelling. *Enz. Microbial Technol.* 29, 181-193.
- Luengo, J. M., García, J. L., and Olivera, E.R. (2001) The phenylacetyl-CoA catabolon: A paradigm of a new type of complex catabolic units with broad biotechnological implications. *Mol. Microbiol.* 39, 1434-42.
- Mateo C, Fernández-Lorente, G, Pessela, B.C., Vián, A, Carrascosa, A.V., García, J.L., Fernández-Lafuente, R, and Guisán, J.M. (2001) Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes. New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions. *J. Chromatogr. A.* 915, 97-106.

- Olivera, E.R., Carnicero, D., García, B., Miñambres, B., Moreno, M.A., Cañedo, L., Dirusso, C.C., Naharro, G., and Luengo, J.M. (2001) Two different pathways are involved in the beta-oxidation of n-alkanoic and n-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* 39, 863-74.
- Olivera, E.R., Carnicero, D., Jodrá, R., Miñambres, B., García, B., Abraham, G.A., Gallardo, A., San Román, García J.L., Naharro, G., and Luengo, J.M. (2001) Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* 3, 1-8.
- De La Mata, I., García, J.L., González, C., Menéndez, M., Cañada, J., Jiménez-Barbero, J., and Asensio, J.L. (2002) The Impact of R53C mutation on the three-dimensional structure, stability, and DNA-binding properties of the human Hex-1 homeodomain. *ChemBiochem.* 3, 726-740.
- De Las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2002) Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* 184, 4988-5000.
- García-Herrero, A., Montero, E., Muñoz, J.L., Espinosa, J.F., Vián, A., García, J.L., Asensio, J.L., Cañada, J., and Jiménez-Barbero, J. (2002) Conformational selection of glycomimetics at enzyme catalytic sites: experimental demonstration of the binding of distinct high-energy distorted conformations of C-, S-, and O-glycosides by *E. coli* β -galactosidase. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4804-4810.
- Jiménez, J.I., Miñambres, B., García, J.L., and Díaz, E. (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 824-843.
- Ladero, M., Santos, A., García, J.L., Carrascosa, A.V., Pessela, B.C.C., and García-Ochoa, F. (2002) Studies on the activity of β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. *Enz. Microbiol. Technol.* 30, 392-405.
- Monterroso, B., Albert, A., Martínez-Ripoll, M., García, P., García, J.L., Menéndez, M., and Hermoso, J.A. (2002) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the complete modular endolysin from Cp-1, a phage infecting *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1487-1489.
- Obregón, V., García, P., García, E., Fenoll, A., López, R., and García, J.L. (2002) Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2545-2554.
- Saiz, J.L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Varea, J., Arrondo, J.L., Lloro, I., García, J.L., Laynez, J., and Menéndez, M. (2002) Characterization of Ejl, the cell-wall amidase coded by the pneumococcal bacteriophage Ej-1. *Protein Sci.* 11, 1788-99.

Artículos de Divulgación/Press Articles

- Bernal, P., Díaz, E., García-Izquierdo, C., García, J.L., de Haro, A., de Lorenzo, V., Hernández, M.T., Marqués, S., Martínez, A., Martínez, M.J., Navarro, J.P., Ortega, J.J., Ramos, J.L., del Río, M., Rojo, F., and Vieitez, A. (2002) La Biotecnología Medioambiental en España: Fundamentos, Situación Actual y Perspectivas. V. de Lorenzo y J.L. Ramos, eds. Red del Consejo Superior de Investigaciones Científicas sobre Biorremediación y Fitorremediación.
- Casal, I., García, J.L., Guisán, J.M., and Martínez-Zapater, J.M. (2002) Biotecnología y Salud: Preguntas y Respuestas, en La Biotecnología en Pocas Palabras Vol. 2. SEBIOT. Madrid.

Libros de Texto/Text Books

- Perera, J., Tormo, A., and García, J. L. (2002) Ingeniería Genética. Vol. 1 y 2. Editorial Síntesis. Madrid.

Patentes/Patents

- Prieto Jiménez, M.A., Moldes Tabarés, C., García González, P., and García López, J.L. (2001) Proteínas de fusión inmovilizadas en gránulos de polihidroxicanoato de cadena media. Patente Española 200102240.
-

Genética Molecular de Aspergillus

Molecular Genetics of Aspergillus

MIGUEL ÁNGEL PENALVA SOTO

Jefe de Grupo / Group Leader

MARÍA TERESA SUÁREZ GONZÁLEZ

Investigadores de Carrera / Staff Scientists

EDUARDO A. ESPESO FERNÁNDEZ (Desde VIII-1999)

OLIVIER VINCENT

**Investigadores Contratados Programa Ramón y Cajal /
Tenure Scientists Ramón y Cajal Program (Desde XII-2002)**

VIVIAN DE LOS RÍOS BENÍTEZ

ELIECER DÍEZ HERNÁNDEZ (Hasta VI-2002)

B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

SUSANA NÉGRETE URTASUN (Desde VIII-2001 a VIII-2002)

Investigadora Visitante / Visiting Scientist

JOSÉ ÁLVARO BLANCO

JAVIER FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

JOSÉ MANUEL RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

JUAN CARLOS SÁNCHEZ FERRERO (Desde III-2001)

B. Predoctorales / Graduate Students

ELENA REBOYO HERNÁNDEZ

Personal Técnico / Technician

Aunque todos los organismos responden al ambiente en cierta medida, para los microbios la variación del ambiente puede ser enorme. La versatilidad metabólica de los hongos es la estrategia clave para enfrentarse a la variación ambiental y una de las virtudes cardinales de los hongos. La capacidad de los hongos para desenvolverse en un amplio rango de pH se debe, en parte, a que poseen interruptores genéticos que ajustan la expresión de genes cuya acción se desarrolla fuera de la célula a las necesidades impuestas por el pH ambiental. Este mecanismo regulador, que denominamos 'regulación de la expresión génica por pH ambiental' hace que, por ejemplo, se sintetice fosfatasa ácida extracelular sólo cuando el ambiente es ácido y no cuando es

Although all organisms respond to their environment to a certain extent, for many microbes environmental variation can be enormous. An important strategy for coping with environmental variation is physiological versatility, a cardinal virtue of many fungi. Their ability to thrive over a wide pH range is due in part to possession of a genetic regulatory system tailoring the expression of genes whose ultimate actions fall outside the cell boundaries to the needs imposed by ambient pH. This genetic regulatory mechanism, that we denote pH regulation of gene expression, enables the synthesis, for example, of an extracellular acidic phosphatase only when the environmental pH is acidic and not when it is alkaline. During the last 10 years and in close

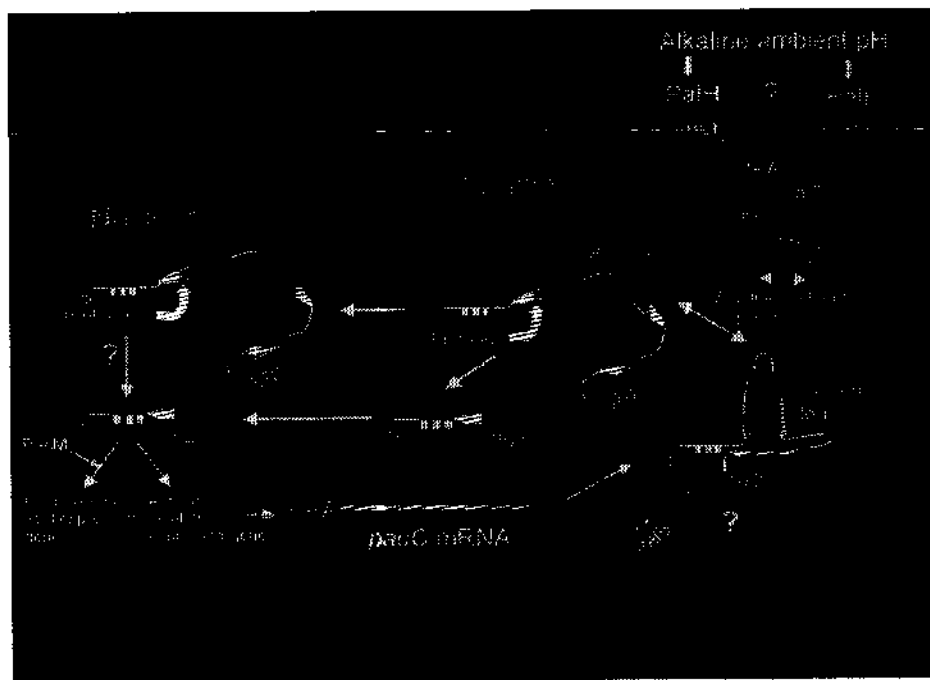
alcalino. Durante los últimos diez años y en estrecha colaboración con el grupo del Prof. H.N. Arst (Imperial College, Londres) hemos estudiado el sistema de regulación por pH de *Aspergillus nidulans*, en el que una nueva ruta de transducción de señal, la ruta *pal*, media el primero de los dos pasos de procesamiento proteolítico que activan el factor de transcripción PacC. Este procesamiento recuerda el de otros factores de transcripción 'famosos' (Ci, NF- κ B, SREBPs). La facilidad con la que *A. nidulans* puede manipularse genéticamente pone a PacC en situación ideal para comprender cómo un factor transcripcional se activa por procesamiento proteolítico en respuesta a una ruta de transducción de señal.

La señalización por pH ambiental ocurre sólo a pH alcalino. En tales circunstancias, la transducción de la señal de pH activa el producto de traducción de *pacC* por un mecanismo proteolítico en dos pasos, que puede compararse a la 'regulated intramembrane proteolysis (Rip)'. En un primer paso, crucialmente regulado por pH ambiental, el producto de traducción PacC de 72 kDa (PacC72) se convierte a un intermediario de 53 kDa

collaboration with Prof. Herbert N. Arst's group (Imperial College, London) we have studied the pH regulatory system of *Aspergillus nidulans*, where a novel signal transduction pathway (the *pal* pathway) mediates the first of two steps in the proteolytic processing activation of a transcription factor (PacC), processing reminiscent of that of some famous higher eukaryotic transcription factors (Ci, NF- κ B, SREBPs). The ease with which *A. nidulans* can be manipulated genetically makes PacC ideally placed for understanding how a transcription factor is activated by proteolytic processing in response to a signal transduction pathway.

Ambient pH signalling occurs only under alkaline conditions. In such circumstances, pH signal transduction activates the otherwise transcriptionally inactive 674 residue PacC translation product by a two step proteolysis mechanism which can be compared to regulated intramembrane proteolysis (Rip). In a first step, which is crucially regulated by ambient pH, the 72 kDa PacC translation product (PacC72) is converted to a 53 kDa intermediate (PacC53) lacking the ~280 C-terminal residues.

This step is catalyzed by a signalling protease, possibly PalB, one of the proteins of the ambient pH signalling pathway. In a second, pH-independent step, this (committed) intermediate is



(PacC53) que carece de los ~280 residuos C-terminales. Este paso está catalizado por una proteasa 'señalizadora', posiblemente PalB, una de las proteínas de la ruta de señalización de pH ambiental. En un segundo paso, independiente de pH, este intermediario predeterminado se convierte al producto de procesamiento de 27 kDa (PacC27), que contiene los ~ 250 residuos N-terminales, por una proteasa procesativa que no ha sido identificada aún. Esta proteasa no requiere la secuencia del punto de corte y reconoce a distancia determinantes de secuencia o estructura localizados aguas arriba de este punto.

La ruta pal es distinta a cualquier otra ruta de transducción de señal conocida. A pesar de que hay homólogos de alguno de los genes pal en eucariotas superiores, sólo se dispone de cierta información sobre su función precisa para cuatro de los productos génicos, PalA, PalB, PalH and PalI. PalA interactúa con PacC72. PalB es una cisteín-proteasa similar a las calpaínas y casi con certeza la proteasa señalizadora. PalH y PalI son proteínas de membrana. La posible función de PalC, que tiene homólogos en hongos pero no en levaduras, se desconoce.

La activación proteolítica de PacC da lugar a la localización nuclear del factor de transcripción, que de no ser procesado proteolíticamente predomina en el citosol. Nuestra comprensión de los mecanismos que median estos cambios de localización subcelular de un factor de transcripción está limitada por la ausencia de información sobre los mecanismos de importación y exportación nuclear en células de hongos filamentosos, en las que el modo de crecimiento hiperpolarizado, junto con la naturaleza multinuclear de las células, impone —creemos— restricciones mecánicas (y, por tanto, la necesidad de nuevas funciones génicas) que no ocurren en levaduras unicelulares. El grupo del Dr. Eduardo Espeso investiga la base molecular de las rutas de importación nuclear usando una fusión chivato GFP::PacC.

El Dr. Olivier Vincent está estudiando la base molecular de la interacción de PalA y PacC72. Ha identificado un tetrapéptido que es reconocido por PalA y sus homólogos en células eucariotas superiores, como AIP1/Alix, una proteína implicada en apoptosis. PalA parece estar conectado a la maquinaria endocitótica. Los retrovirus se aprovechan de componentes de la 'multivesicular body pathway' para extruirse de la membrana plasmática de las células infectadas, y se ha hipotetizado que los homólogos de palA de mamíferos serían usados por ciertos retrovirus como adaptadores que conectan la maquinaria endocitótica a la proteína mayoritaria de la cubierta de ciertos virus.

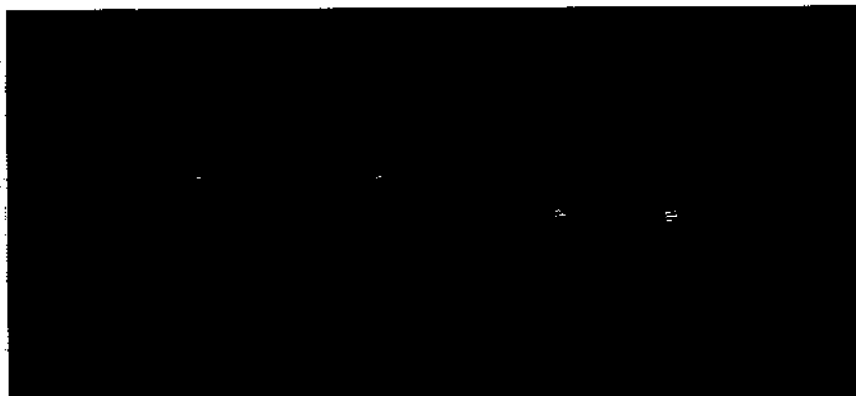
converted to a 27 kDa processing product (PacC27) containing the ~ 250 N-terminal residues by an as yet unidentified processing protease. This protease does not require the sequence at the cleavage site and appears to recognize at a distance sequence or structure determinants located upstream of this site.

The pal pathway is unlike any other known signal transduction pathway. Despite the presence of homologues for some pal genes in higher eukaryotes, only for four of the six pal gene products, PalA, PalB, PalH and PalI, is any information about the precise biochemical function available. PalA interacts with PacC72. PalB is a calpain-like cysteine protease, most likely the signalling protease. PalH and PalI are membrane proteins. Possible functions for PalC, for which homologues are present in other filamentous fungi but apparently not in yeasts, and PalF are currently elusive.

PacC proteolytic activation results in nuclear import of the otherwise predominantly cytosolic PacC. Our understanding of the mechanisms mediating these changes in the subcellular localisation of a transcription factor is limited by the absence of information on the mechanisms of nuclear import and export in filamentous fungal cells, where the hyperpolarized mode of growth combined with the multinuclear nature of these cells imposes —we believe— mechanistic constraints (and therefore the need for novel gene functions) that are not found in unicellular yeasts. The group of Dr. Eduardo Espeso is currently investigating the molecular basis of nuclear import pathways, using a GFP::PacC protein fusion as a reporter.

Dr. Olivier Vincent is currently studying the molecular basis of the interaction of PalA and PacC72. He has identified a tetrapeptide motif which is recognised by PalA and its higher eukaryotic homologues, including AIP1/Alix, a mammalian protein involved in apoptosis. PalA appears to be connected to the endocytotic machinery. Retroviruses subvert components of the multivesicular body pathway to bud off the plasma membrane of infected cells and it has been hypothesised that mammalian PalA homologues are used by certain retroviruses as adaptors connecting the endocytotic machinery to their envelope proteins.

Dr. Miguel Ángel Peñalva is using *Aspergillus nidulans* genomic resources for the *in silico* prediction of all genes involved in the endocytotic machinery. pH regulation and the adaptability of *Candida albicans* to different pH environments appears to be a key factor for its pathogenicity, and Dr. Peñalva is



El Dr. Miguel Ángel Peñalva está usando recursos genómicos de *A.nidulans* para la predicción *in silico* de los genes del hongo implicados en los pasos conservados de endocitosis. Dado que la regulación por pH y la adaptabilidad de *Candida albicans* a diferentes ambientes respecto al pH parece ser un factor clave de su patogenicidad, Miguel Peñalva está elucidando la función molecular precisa de PalC, el único componente de la ruta señalizadora que es exclusivo de hongos filamentosos. También está estudiando la naturaleza molecular de la proteasa que media el segundo paso proteolítico de la ruta que da lugar a PacC activo.

El moho aspergillus como organismo modelo para el estudio de metabolopatías congénitas en humanos

La segunda línea de investigación de Miguel A. Peñalva se basa en su propuesta original para la utilización de *A. nidulans* como modelo para enfermedades hereditarias humanas del metabolismo. Esta propuesta se basa en la enorme versatilidad metabólica de *A. nidulans*, que es capaz de utilizar la mayoría de los aminoácidos como fuente de carbono a través de rutas metabólicas análogas a las que funcionan en hepatocitos humanos. El análisis *in silico* de las bases de datos del genoma humano usando sondas de *Aspergillus* ha permitido la identificación del gen humano de alcaptonuria, del gen humano de maleilacetoacetato isomerasa y, recientemente, del gen de una subunidad de la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa.

currently approaching the precise molecular function of PalC, the only pH signalling pathway component unique to filamentous fungi. He is also characterising the molecular nature of the protease mediating the second proteolytic step in the pathway leading to fully active transcription factor.

The mould Aspergillus as a model organism for studying human inborn errors of metabolism

Miguel Á. Peñalva's second research interest is based on his original proposal of using *A. nidulans* to understand uncharacterised human inborn errors of metabolism. This proposal is based on the large metabolic versatility of this mould, which resembles to a significant extent that of human hepatocytes. The fungus is able to grow on most amino acid as sole carbon source using the same metabolic pathways working in human hepatocytes. *In silico* analysis of databases using fungal protein sequences as probes allowed the identification of human genes for alcaptonuria, for maleylacetoacetate isomerase or, more recently, of the gene for one of the subunits of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase.

We have recently been studying 3-methylcrotonylglycinuria (an inborn error of leucine metabolism), in collaboration with Magdalena Ugarte's and S. Rodríguez de Córdoba's groups. This work has led to the molecular characterisation of the two genes involved in the disease and the genotyping of causative mutations in affected patients. MS/MS screening of newborns

Hemos estudiado recientemente la 3-metilcrotonilglicinuria (un error congénito del metabolismo de leucina), en colaboración con los grupos de Magdalena Ugarte y Santiago Rodríguez de Córdoba. Este trabajo ha conducido a la caracterización molecular de los dos genes implicados en la enfermedad y al despistaje de mutaciones en estos genes. La metilcrotonilglicinuria es posiblemente la acidemia orgánica más frecuentes en ciertas áreas geográficas, tal como ha revelado el análisis masivo de neonatos por MS/MS. En la actualidad, estamos usando modelos fúngicos basados en cepas con disrupciones génicas para caracterizar las bases bioquímicas y genéticas de otros errores congénitos del metabolismo de aminoácidos.

has revealed that 3-methylcrotonylglycinuria is the most frequent organic acidemia in certain geographic areas. We are currently characterising, using fungal models based on disruption strains, the biochemical and genetic bases of other inborn errors of amino acid catabolism.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, 2FD97-1292 (2000-2002)
- UE, QLRT-00729-1999 (2000-2003)
- CICYT, BIO2000-0920 (2001-2004)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Elicer Díez Hernández. Activación proteolítica del factor de transcripción PacC. Universidad Autónoma de Madrid, 2001. Director: Dr. M.A. Peñalva Soto.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Gallardo, M.E., Desviat, L.R., Rodríguez, J.M., Esparza-Gordillo, J., Pérez-Cerdá, C., Pérez, B., Rodríguez-Pombo, P., Criado, O., Sanz, R., Morton, D.H., Gibson, M.K., Le, T.P., Ribes, A., Rodríguez de Córdoba, S., Ugarte M., and Peñalva, M.A. (2001) The molecular basis of 3-methylcrotonylglycinuria, a disorder of leucine catabolism. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 334-346.
- Mingot, J.M., Espeso, E.A., Díez, E., and Peñalva, M.A. (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1688-1699.

- Peñalva, M.A. (2001) A fungal perspective on human inborn errors of metabolism: alkaptonuria and beyond. *Fungal Genet. Biol.* 34, 1-10.
 - Rodríguez-Saiz, M., Barredo, J.L., Moreno, M.A., Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A., and Díez, B. (2001) Reduced function of a phenylacetate-oxidizing cytochrome p450 caused strong genetic improvement in early phylogeny of penicillin-producing strains. *J. Bacteriol.* 183, 5465-5471.
 - Vincent O., Townley, R., Kuchin, S., and Carlson, M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes and Development* 15, 1104-1114.
 - Vincent, O., Kuchin, S., Hong, S.P., Townley, R., Vyas, V., and Carlson, M. (2001) Interaction of the Srb10 kinase with Sip4, a transcriptional activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5790-5796.
 - Zaragoza, O., Vincent, O., and Gancedo, J.M. (2001) Regulatory elements in the FBP1 promoter respond differently to glucose-dependent signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 359, 193-201.
 - Díez, E., Álvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suárez, T., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr. and Peñalva, M.A. (2002) Activation of the *Aspergillus* PacC zinc-finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* 21, 1350-1359.
 - Peñalva, M.A., and Arst, H.N., Jr. (2002) Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 66, 426-446.
-

Iniciadores de la replicación del DNA y sistemas de muerte condicional en microorganismos

DNA replication initiators and conditional death systems in micro-organisms

RAMÓN DÍAZ OREJAS
Jefe de Grupo / Group Leader
ELENA FERNÁNDEZ-TRESGUERRES
RAFAEL GIRALDO SUÁREZ
Investigadores de Carrera / Staff Scientists

MARC LEMONNIER
BELÉN NÚÑEZ PASCUAL (Hasta IX-2002)
ROSARIO SABARIEGOS JAREÑO (Hasta IX-2001)
Investigadores Contratados / Research Associates

CRISTINA DÁVILA FAJARDO
TERESA DÍAZ LÓPEZ
BEATRIZ MAESTRO GARCÍA-DONAS (Hasta V-2001)
ANA JOSEFA MUÑOZ GÓMEZ
ALICIA SÁNCHEZ GORDIAGA
SANDRA SANTOS SIERRA (Hasta VII-2002)
B. Predoctorales / Graduate Students

CONSUELO PARDO ABARRIO
ANA M^a. SERRANO LÓPEZ
Personal Técnico / Technicians

Palabras clave: Replicación del DNA, Iniciadores (RepA/ORC), Toxinas y antitoxinas bacterianas (Kid, Kis), Plásmidos, Estructura y función de proteínas y del DNA

Keywords: DNA replication, Initiators (RepA/ORC), Bacterial toxins (Kid), and antitoxin (Kn), Bacterial plasmids, Structure-function of proteins and DNA

Biología Molecular de iniciadores de la replicación del DNA

RepA (26 kDa) es la proteína iniciadora de la replicación del DNA del plásmido pPS10 (un replicón específico de *Pseudomonas* aislado por nuestro grupo). RepA actúa también como represor transcripcional de su propia síntesis. Estudiando las bases moleculares de ambas funciones, hemos identificado:

Molecular Biology of DNA replication initiators in microorganisms

RepA (26 kDa) is the DNA replication initiator protein of the plasmid pPS10 (a replicon specific of *Pseudomonas* isolated by our group). RepA also acts as a transcriptional repressor of its own synthesis. As a result of our studies on the molecular basis of both functions, we have found:

- Dos formas distintas de RepA, con funciones *contrapuestas*: iniciación (monómeros) y represión (dímeros).

- En la secuencia de RepA, motivos que contribuyen a las interacciones proteína-proteína (cremallera de leucinas, LZ) y proteína-DNA (alfa hélice-giro beta- alfa hélice, HTH).

- Las secuencias de DNA reconocidas por RepA: cuatro repeticiones directas de 22 pb (iterones) en el origen de replicación y una repetición inversa de 8 pb (operador) en el promotor de repA.

- Dos dominios globulares en RepA (del tipo "winged-helix", WH) que adoptan conformaciones alternativas: compacta (en los dímeros) y elongada (en los monómeros). El primer dominio (WH1) contiene un motivo adicional de interacción con el DNA, que permanece críptico en la conformación compacta, mientras que colabora con el HTH (situado en el segundo dominio, WH2) en el reconocimiento de los iterones por la conformación elongada de RepA.

- Mutaciones en el dominio WH1 de RepA amplían el rango de huésped de pPS10 a Enterobacterias. Por otra parte, un mutante afectado en la proteína iniciadora de la replicación del DNA en E.coli (DnaA) permite el establecimiento del plásmido pPS10 en esta bacteria. Estas mutaciones, junto con las descritas en RepA, indican la existencia de interfases de interacción entre proteínas replicativas de plásmido y huésped.

- Los iniciadores de la replicación eucarióticos Orc4 y Cdc6 presentan en sus extremos C-terminales dominios WH similares al de RepA, así como otras similitudes que incluyen su estado de asociación y su interacción con chaperonas de la familia Hsp70. Estos resultados sugieren la presencia de un mismo módulo estructural y funcional en la proteína de replicación del ancestro hipotético de todas las formas de vida celulares.

Sistemas de muerte condicional bacteriana: el sistema parD del plásmido R1

-parD (kis, kid) es un sistema de muerte condicional que fué encontrado en nuestro laboratorio en el factor de resistencia a antibióticos de enterobacterias R1. Este sistema forma parte de los sistemas de mantenimiento del plásmido R1. El sistema parD es un operón que codifica para dos pequeñas proteínas, una toxina (Kid por determinante de "killing", 12 kDa) y una anti-toxina (Kis por supresor de Kid, 10 kDa). Kid es capaz de inhibir proliferación celular en procariontes y eucariotes (resultados en

- Two different species of RepA protein, with opposite functions: DNA replication initiation (monomers) and transcriptional repression (dimers).

- In RepA protein sequence, motifs that contribute to protein-protein (LZ-like) and protein-DNA (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 globular "winged-helix"(WH) domains in RepA that adopt alternative conformations: compact (in the dimers) and elongated (in the monomers). The first domain (WH1) contains an additional DNA binding-motif that remains hidden in the compact conformation, but co-operates with the HTH motif (found in the second domain, WH2) in binding to the iterons by the RepA elongated conformation.

- Mutations affecting the WH1 domain in RepA broaden the host-range of pPS10 to Enterobacteria. On the other hand a mutant in the replication initiator protein of E.coli (DnaA) allows the establishment of the pPS10 plasmid in that host. These mutations, as well as those described in RepA, point to the existence of interphases for interaction between replicative proteins from plasmid and host bacterium.

- The eukaryotic DNA replication initiators Orc4 and Cdc6 have at their C-termini a WH domain, similar to that found in RepA. Similarities also extend to their association state and to their association with chaperones of the Hsp70 family. These findings suggest that a common functional and structural protein module was present in the DNA replication initiator of the ancestor of all present cellular forms.

Conditional killer systems in bacteria

-parD (kis, kid) is a conditional killer system found in the drug resistance factor R1 of enterobacteria and it is one of the maintenance systems of this plasmid. ParD is an operon coding for two small proteins, Kid (12 kDa) a toxin, and Kis (10 kDa), an antitoxin. These proteins are active also in eukaryotes, where Kid can inhibit proliferation and Kis protects. Kis and Kid form a complex that inactivate the toxin and form the corepressor of the system.

Within a collaboration with a group of crystallography at the University of Sheffield (D. Rice and J. Rafferty) the structure of the Kid toxin has been solved at 1.4 Å. The structure of Kid

eucariotas elaborados en colaboración con el Prof. R. Laskey, U. Cambridge, U.K.). La interacción toxina-antitoxina neutraliza la acción de Kid y da lugar a un complejo que regula la transcripción del operón *parD*

-Se ha obtenido la estructura de la toxina Kid mediante cristalografía a una resolución de 1.4 Å (colaboración con el grupo del Prof. D. Rice, Universidad de Sheffield, U.K.) y se tienen datos de NMR sobre las estructuras en solución de la toxina y de la antitoxina (colaboración con el grupo del Prof. R. Boelens, Bijvoet Center, U. Utrecht, N.L.).

-Se han definido genéticamente regiones de la antitoxina Kis implicadas en co-regulación (Kis y Kid regulan coordinadamente el operon *parD*) y en antitoxicidad, y regiones en la toxina implicadas en co-regulación, toxicidad y estabilidad estructural.

-El análisis comparado de la estructura de Kid con el banco de estructuras conocidas y la información genética disponible indican que existe un módulo estructural común compartido por la toxina CcdB y probablemente por otras toxinas de sistemas con funciones similares. En Kid, CcdB distintas regiones de este módulo funcional se han adaptado para alcanzar distintas dianas.

-Kid y CcdB llegan a distintas dianas. CcdB es un inhibidor de topoisomeras II mientras que Kid inhibe síntesis de proteínas y es capaz de degradar mRNA en combinación con un factor celular no determinado. Se está explorando si Kid lo mismo que RelE corta específicamente el mRNA en el sitio A del ribosoma. También se prosiguen estudios para establecer si efectos adicionales de la toxina (inhibición específica de determinados sistemas de replicación) son consecuencia del mismo mecanismo básico de acción.

-Se ha iniciado un análisis proteómico y genómico cuyo objetivo es explorar la respuesta celular global a la inducción de las toxinas Kid, y ChpAK.

defines a common structural module which is shared by apparently unrelated toxins, as the CcdB toxin of plasmid F. Different regions of this common module are adapted to reach different targets. Information on the NMR structure in solution of Kid and Kis and on their interactions is now being obtained in collaboration with the group of Prof. R. Boelens, Utrecht University.

The genetic analysis identified residues/regions in the antitoxin Kis involved in co-regulation and antitoxicity and residues/regions in the toxin involved in toxicity, co-regulation and structural stability.

The Kid toxin is able to inhibit proteins synthesis and is able to degrade mRNA in extracts of *E. coli*. In spite of the apparent lack of homology with RelE, a toxin which inhibits protein synthesis cutting specifically mRNA codons at the A site of the ribosome, both toxins could share a common mechanism of action as well as a common structure. We are exploring if this basic mechanism of action could explain additional effects of this toxins such as protection of Kid action by over-expression of specific genes of the host, such as *dnaB*, and the inhibition of *ColE1* and λ DNA replication systems.

We continue analyzing structure-function correlations in the *parD* system and in the homologous *chpA* system (of chromosomal origin) using an structural-functional approach. In addition we are analyzing at a genomic and proteomic level the response of the cell to the induction of the Kid and ChpAK toxins.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- MEC-CICYT, BIO99-0859-C03 (1999-2002), PM99-0096 (2000-2003)
- CA, CP 2000-2003 (2000-2003)
- EC, QLK2-CT-2000-00634 (2000-2003)
- MEC-CICYT, PM99-0096 (2000-2003)

- MCyT, SAF2002-04649 (2002-2005)
- CAM, Programa Grupos Estratégicos (2000-2003)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Sandra Santos Sierra. Análisis genético y bioquímico de las proteínas Kis y Kid del sistema parD del plásmido R1. Universidad Complutense de Madrid. Mayo, 2002. Director: Dr. Ramón Díaz Orejas

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Giraldo, R., and Díaz-Orejas, R. (2001) Similarities between the DNA replication initiators of Gram-negative bacteria plasmids (RepA) and eukaryotes (Orc4)/archaea (Cdc6p). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4938-4943.
- Hargreaves, D., Santos-Sierra, S., Giraldo, R., Sabariego-Jareño, R., de la Cueva-Méndez, G., Boelens, R., Díaz-Orejas, R., and Rafferty, J.B. (2002) Structural and functional analysis of the Kid toxin protein from *E. coli* plasmid R1. *Structure* 10, 1-9.
- Hargreaves, D., Giraldo, R., Santos-Sierra, S., Boelens, R., Rice, D. W., Díaz Orejas, R., and Rafferty, J.B. (2002) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the parD-encoded protein Kid from *Escherichia coli* plasmid R1. *Acta Crystallog. D*, 58, 355-358.
- Maestro, B., Sanz, J.M., Faelen, M., Couturier, M., Díaz-Orejas, R., and Fernández-Tresguerres, E. (2002) Modulation of pPS10 host range by DnaA. *Mol. Microbiol.* 46, 223-234.
- Potrykus, K., Santos-Sierra, S., Lemonnier, M., Díaz-Orejas, R., and Wegrzyn, G. (2002) Differential effects of Kid toxin on two modes of replication of lambdaoid plasmids suggests that this toxin acts before, but not after, the assembly of the replication complex. *Microbiology* 148, 2489-2495.
- Santos-Sierra, S., Pardo-Abarrio, C., Giraldo, R., and Díaz-Orejas, R. (2002) Genetic identification of two functional regions in the antitoxin of the parD killer system of plasmid R1. *FEMS Microbiology Letters* 206, 115-119.

Próximos artículos/Forthcoming articles

- De la Cueva-Méndez, G., Mills, A.D., Clay-Farrace, L., Díaz-Orejas, R. and Laskey, R. (2003) Regulatable killing of eukaryotic cells by the prokaryotic proteins Kid and Kis. *EMBO J.* 22, 246-251.
 - Giraldo, R. (2003) Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 533-554.
 - Maestro, B., Sanz, J.M., Díaz-Orejas, R., and Fernández-Tresguerres, E. (2003) Modulation of pPS10 host range by plasmid-encoded RepA initiator protein. *J. Bacteriol.* 185, 1367-1375.
-

Biología Molecular de Hongos Basidiomicetos *Molecular Biology of Basidiomycete Fungi*

ALDO E. GONZÁLEZ BECERRA
Jefe de Grupo / Group Leader
Investigador de Carrera / Staff Scientist

M^a CARMEN TERRÓN ORELLANA
B. Postdoctorales / Postdoctoral Fellows

AINHOA ARANA CUENCA (Hasta I-2001)
JOSÉ M^a CARBAJO GARCÍA
TANIA GONZÁLEZ DÍAZ DE VILLEGAS (Hasta IX-2001)
RICARDO SILVA SOTO (Hasta VII-2002)
ALEJANDRO TÉLLEZ JURADO (Hasta I-2001)
SUSANA YAGÜE PLAZA
B. Predoctorales / Graduate Students

MARÍA LÓPEZ FERNÁNDEZ (VII-2002)
ARANTXA RODA MORAZA (VII-2002)
Pregraduados / Undergraduate students



Producción y caracterización de enzimas para su aplicación a procesos de degradación

Los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca han demostrado su capacidad para degradar o transformar una amplia variedad de sustratos naturales complejos de tipo aromático, así como compuestos derivados de actividades industriales. Continuando con las metas que se ha planteado este laboratorio a largo plazo se ha profundizado en el estudio de las capacidades del complejo enzimático de este grupo de hongos y su aporte a la mejora de procesos o productos industriales, así como, al tratamiento de ambientes contaminados por estas moléculas complejas. Se han llevado a cabo estudios bajo diferentes condiciones de cultivo en fase sólida y líquida para determinar como les afectan los parámetros en estudio (pH, temperatura, presión de oxígeno, presencia de metales) a la actividad enzimática oxidante en condiciones controladas de laboratorio. En primer lugar se han tratado efluentes y colorantes industriales con cepas que han demostrado capacidad para crecer sobre ellos.

Production and characterization of enzymes for their application to degradation processes

The white-rot basidiomycetous fungi have demonstrated their capacity of degrading or transforming a wide variety of complex natural aromatic substrates as well as compounds derived from industrial activities. Going on with the goals of this laboratory we have studied deeply the capacities of the enzymatic complex of these fungi and their contribution for improving industrial processes or products as well as the treatment of environments polluted with this complex molecules. We have carried out studies under different culture conditions (liquid and solid cultures) to determine how the different parameters (pH, temperature, oxygen pressure, metal presence) affect the oxidative enzymatic activity under controlled conditions at the laboratory scale. First we have treated industrial effluents and dyes with strains able to grow on them. In a second step, these substrates have been treated with enzymatic crude rich in a given enzyme and finally, with purified laccases. A combined treatment of

En una segunda fase se han tratado estos sustratos con crudos enzimáticos con alta actividad de una determinada enzima y finalmente se han tratado con las lacasas purificadas. Se ha logrado un tratamiento combinado de pasta de madera con un crudo enzimático que ha dado lugar a una patente industrial. En esta investigación se han incluido estudios sobre inductores específicos y sobre la capacidad de algunos de ellos para actuar como estabilizadores de las enzimas para prolongar su actividad sobre los sustratos. En esta línea se ha colaborado con los laboratorios del Dr. Juan Carlos Villar del INIA, Madrid, Dra. Mar Villamiel, IFI, CSIC, Madrid, Drs. Carmen Martín y M^a José Blanco, IER, CIEMAT y la Dra. Esperanza Valdés, ICIDCA, La Habana, Cuba.

Regulación de la transcripción de enzimas oxidantes bajo diferentes condiciones de cultivo. Expresión heteróloga de las lacasas

Una segunda línea se ha orientado al estudio de capacidades específicas de cuatro cepas de hongos basidiomicetos que habrán demostrado su habilidad para decolorar/degradar los sustratos antes mencionados. Se ha llevado a cabo la monitorización de las actividades enzimáticas para conocer la influencia de los parámetros en la producción de los máximos de actividad y los posibles mecanismos implicados en la variación de los patrones enzimáticos de las mismas. Se ha considerado importante la influencia de la fuente de carbono y/o nitrógeno en la presencia de las diferentes isoformas en los caldos de cultivo y su posible influencia en la regulación de la transcripción. El caso más evidente es cuando el hongo posee una familia de genes que codifican para una actividad enzimática. Se ha encontrado que una amplia variedad de compuestos de tipo aromático actúan como inductores de una actividad enzimática produciendo un incremento de varias magnitudes de la misma cuando esta presente un determinado compuesto o una mezcla de ellos (residuos o efluentes industriales) en el medio de cultivo. En el caso de la lacasa (proteína azul) y la manganeso peroxidasa, el cobre y el manganeso a diferentes concentraciones actúan como inductores a nivel de la transcripción de ambas familias de genes lo que se ha demostrado por estudios de RT-PCR múltiple. En el caso de las lacasas que es en el que mas hemos profundizado se ha demostrado utilizando varios isómeros de una misma molécula que actúan de forma directa sobre cada gen en particular produ-

wood pulp with on enzymatic crude have been designed in our laboratory giving rise to an industrial patent. In this research some studies regarding specific inducers have been included and the capacities of some of them as enzyme stabilizers to enlarge their activities on the substrates have been analysed. In this line we have collaborated with the laboratories of Dr. Juan Carlos Villar from INIA, Madrid, Dr. Mar Villamiel, IFI, CSIC, Madrid, Drs. Carmen Martín and M^a José Blanco, IER, CIEMAT, and Dr. Esperanza Valdés, ICIDCA, Havana, Cuba.

Regulation transcription of oxidative enzymes under different cultures conditions. Laccase heterologous expression

A second research line have been focused on the capacities of four basidiomycetous fungal species that have demonstrated their ability to decolorize/degrade the substrates mentioned before. The monitorization of enzymatic activities have been carried out in order to know the influence of the parameters in the production of maximum activities and the possible mechanisms implicated in the variation of their enzymatic patterns. The influence of carbon and/or nitrogen sources in the presence of different isoforms in the extracellular fluids, as well as, the influence of these nutrient sources in the regulation transcription have been considered important. The most evident case is when the fungus has a gene family codifying for a enzymatic activity. A wide variety of aromatics compounds have shown to act as inducers of such enzymatic activity, giving rise to several-fold increments of this activity when a given compound or a complex mixture of them (raw materials or effluents) are present in the culture medium. Several studies of multiplex RT-PCR have suggested that in the case of laccase (blue protein) and manganese peroxidase (MnP), different concentration of copper and manganese act as inducers of both gene-family at transcription level. In relation with laccases, that have been the most studied in our laboratory, we have demonstrated that several isomers of a given molecule act in a direct way over each particular gene producing a differential regulation of this gene family. In addition, the triggs of each gene contribute to the total enzymatic activity measured spectrophotometrically and to the isozymes patterns observed in a time-course production under given culture conditions. The knowledge of this mechanisms allow to optimise the production of a given type of enzymes for its potential biotechnological applications. Once obtained the DNAC of laccase

ciendo una regulación diferencial de esa familia de genes y que el encendido de cada uno de ellos se traduce en la sumatoria de la actividad enzimática que se presenta por un lado, en los diferentes máximos y en los patrones de isoformas que podemos encontrar, en una cinética en determinadas condiciones de cultivo. El conocimiento de estos mecanismos permite optimizar la producción de un determinado tipo de enzima para su potencial aplicación en biotecnología. Una vez obtenido los ADN de los genes de lacasa se llevó a cabo la transformación heteróloga en levaduras y hongos filamentosos, obteniéndose clones que expresaban la proteína recombinante en cultivo sólido. Los inductores naturales usados en nuestro laboratorio han permitido conocer los mecanismos de inducción mejorando la producción de las actividades enzimáticas. En este trabajo hemos colaborado con el grupo del Dr. Alan Dobson, Microbiology Dpto. U. Cork, Irlanda, el Dr. Angel Domínguez, Departamento de Microbiología y Genética, CSIC, U. Salamanca y la Dra. María Fernández-Lobato, Fac. Ciencias, U. Autónoma, Madrid.

Nuevas actividades enzimáticas en ambientes extremos.

Una tercera línea se orientó a la búsqueda de actividad de enzimas extracelulares oxidantes en hongos que crecen en ambientes extremófilos a altas temperaturas y pH ácido, en una amplia colección de más de mil cepas aisladas de Río Tinto y una doscientas de la zona tropical de México en Mérida, Yucatán, se han puesto a punto cinéticas para determinar actividad lacasa y manganeso peroxidasa a pH ácido y 50 °C de temperatura. El objetivo es encontrar enzimas oxidantes producidas en ambientes extremos que se pudieran aplicar al biotratamiento de suelos. En este proyecto colaboramos con laboratorios mexicanos que han suscrito un convenio con Petróleos Mexicanos (PEMEX). Se han llevado estudios con peroxidases producidas por vegetales para estudios comparativos con sus correspondientes de hongos. Se ha utilizado la taxonomía molecular mediante ITS para la identificación de cepas de basidiomicetos del género *Trametes*. En estos estudios hemos colaborado con los siguientes grupos: Dr. Ricardo Amils, Fac. Ciencias U. Autónoma, Madrid, Dr. Gustavo Viniegra, Dpto. Biotecnología, U. Autónoma Metropolitana, México D.F., Dra. Sara Solís, del Dpto. de Biotecnología, U. de Mérida, Dr. Carlos Regalado, U. Querétaro, México.

gens their heterologous expression was tried using as a host different species of yeast and hiphomycetes, giving rise to positive clones that expressed the recombinant protein in solid cultures. The natural inducers using in our laboratory allowed to know the inductions mechanisms, improving the production of enzymatic activities. In this work we have collaborated with the team of Dr. Alan Dobson, Microbiology Department. U. Cork, Irlanda, Dr. Angel Domínguez, Instituto de Biología Molecular y Genética, CSIC, U. Salamanca, and Dr. María Fernández-Lobato, Fac. Ciencias. U. Autónoma, Madrid.

New enzymatic activities in extreme-environments.

A third research-line was oriented to look for extracellular oxidative enzymes in fungi growing in extreme environments such as high temperatures and acid pH. The screening was done over a wide collection of more than one thousand strains isolated from Tinto River and two hundred strains from tropical zone of México in Mérida, Yucatán. Some methods to determine lacase and manganese peroxidase activities at acid pH and 50 °C, were set up. The objective is to find oxidative enzymes produced in extreme-environments that could be applied to soil bioremediation. In this project we have collaborated with one of the Mexican laboratories that was signed a deal with "Petróleos Mexicanos" (PEMEX). Comparative studies between peroxidases produced by plants and the corresponding enzymes excreted by fungi have been carried out. The molecular taxonomy was used to determine a *Trametes* genera basidiomycete species by means ITS methods. In this line we collaborated with the following groups: Dr. Ricardo Amils, Fac. Ciencias U. Autónoma, Madrid, Dr. Gustavo Viniegra, Dpto. Biotecnología, U. Autónoma Metropolitana, México D.F., Dr. Sara Solís, Dpto de Biotecnología, U. de Mérida, and Dr. Carlos Regalado, U. Querétaro, México.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DG, XII RTD 96-8021 (1998-2001)
- CONACYT /México, 29298-B (1999-2001)
- CONACYT / México, (2000-2002)
- CICYT, REN2002-01929 (2002-2005)

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Tania González Díaz de Villegas. Aspectos fisiológicos y moleculares de la decoloración enzimática de efluentes de destilería con el basidiomiceto *Trametes* sp. I-62. Universidad de Alcalá. Julio, 2001. Director: Dr. Aldo E. González.
- Alejandro Téllez Jurado. Estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares de la lacasa producida por *Heterobasidion annosum* (Fr.:Fr.) Bref. (estado conidial = *Spiniger meiereckellus* (A.J. Olsen) Stalpers. Universidad de Alcalá. Enero, 2002. Director: Dr. Aldo E. González
- Ainhoa Arana Cuenca. Aplicaciones de la biología molecular: Identificación del basidiomiceto *Trametes* sp. I-62 y Expresión heteróloga del gen *cglcc1* en *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*. Universidad Autónoma de Madrid. Enero, 2002. Director: Dr. Aldo E. González
- Ricardo A. Silva Soto. Obtención de enzimas ligninolíticas producidas por hongos basidiomicetos. Evaluación de su aplicación al blanqueo de pastas de maderas. (CEFOR- INIA), Universidad Politécnica de Madrid, 2002. Directores: Drs. Aldo E. González y Juan C. Villar.

Publicaciones/Publications

Artículos en Revistas/Journal Articles

- Carbajo, J.M., Junca, H., Terrón, M.C., González, T., Yagüe, S., Zapico, E., and González, A.E. (2002) Tannic acid induces transcription of laccase gene *cglcc1* in the white-rot fungus *Coriopolisis gallica*. *Can.J. Microbiol.* 48, 1041-1047.

Próximos artículos/ Forthcoming Articles

- González, T., Terrón, M.C., Zapico, E., Yagüe, S., Téllez, A., Junca, H., and González, A.E. (2003) Identification of a new laccase gene and confirmation of genomic predictions by cDNA sequences of *Trametes* sp. I-62 laccase family. *Mycol. Res.* (en prensa/in press).

Patentes / Patents

- González Becerra, A.E., Villar Gutiérrez, J.C., y Silva Soto, R.A. (10 de Julio 2002) Procedimiento para la designificación de pastas de celulosa. Numero: P200201617.
-

Premios y Distinciones

Awards and Honours

— **Ángela Casado Moragón**

Evaluadora de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina), 2001.

Miembro del Comité Científico de las Primeras Jornadas sobre Nuevas Perspectivas en el Cuidado de la Salud. Granada, Noviembre, 2002.

— **Ángela Casado Moragón, M^a Encarnación López-Fernández y Rocío Ruíz**

Primer Premio del Comité Científico de las XIII Jornadas Nacionales de Sanitarios de Bomberos (declaradas de interés sanitario por el Instituto de Estudios de la Salud de la Generalitat de Catalunya), a la Comunicación “Análisis de la respuesta antioxidante frente al estrés laboral”. Barcelona, Septiembre, 2001.

— **Consuelo de la Torre García-Quintana**

Profesor del International Training Course on Signalling to Growth and Cell Division in Arabidopsis, patrocinado por la ICRO, UNESCO. University of London, Royal Holloway, Egham, Julio, 2001.

Premio Científico del Ministerio del Azúcar de Cuba como Miembro del grupo de investigación, en la categoría Mejor Trabajo Científico año 2001, bajo el lema “Caracterización genómica y citológica de cultivares de caña de azúcar mediante técnicas avanzadas”.

Premio Anual 2001 de la Cátedra Álvaro Reinoso de la Universidad de La Habana, por los resultados obtenidos en variedades híbridas cubanas de la caña de azúcar.

Miembro del Comité Editorial de la revista *Cell Biology International*, (Grupo Elsevier), 2002.

— **Ramón Díaz Orejas**

Miembro de la Junta Editorial de FEMS Microbiology Reviews. Desde Enero, 2000.

Miembro de la Junta Supervisora del “*Centre of Bio-Safety Research and Molecular Biomedicine*” de la Universidad de Gdansk (Polonia). Desde 2002.

— **José Ramón Díaz-Ruiz Alba**

Miembro del Consejo de Redacción de la Revista “Investigación Agraria. Serie Producción y Protección Vegetales”. Publicación del INIA, 2001 y 2002.

Miembro del Comité Editorial de la Revista Virología. Publicación Oficial de la SEV, 2001 y 2002.

Miembro del Consejo de Redacción de la Revista Phytoma-España, 2001 y 2002.

— **Carlos Fernández-Tornero**

Premio Joseph Tormo 2002 y Premio de la Academia de Doctores 2002 a la Tesis Doctoral: *A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. Implications for rational drug design*. Directores: Drs. Guillermo Giménez-Gallego y Antonio Romero. Universidad Autónoma de Madrid, 2002

— **Gonzalo Giménez Martín**

Conferencia inaugural del VIII Congreso Iberoamericano de Biología Celular: “*Nucleogenesis and the factors involved in it*”. Lima, Perú, Septiembre, 2001.

Miembro extraordinario del Colegio Nacional de Biólogos del Perú. Septiembre, 2001.

Miembro del Comité Editorial de la revista Biocell. 2002.

— **Aldo González Becerra**

Premio: Aspectos fisiológicos y moleculares de la decoloración enzimática de efluentes de destilería con el basidiomiceto *Trametes* sp. I-62. Autores. González, T., Terrón, M.C., Yagüe, S., Téitez, A., Junca, H., Carbajo, J.M., Arana, A., González, A.E. y Zapico E.J. Mejor trabajo de investigación en la categoría Joven, XIV Forum II Etapa, ICIDCA, La Habana, Cuba. Julio, 2002. Distinción: Nombramiento como Asesor Científico del Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico de la VIII Región del Bio-Bio, Concepción, Chile, 2001.

— **Santiago Lamas**

Premio de Investigación Básica en Nefrología de la Fundación Renal "Iñigo Álvarez de Toledo", 2001.

— **Rubens López García**

Miembro de la Sociedad Española de Quimioterapia.

— **Rubens López García y Ernesto García López**

Miembros del Consejo Editorial de la Revista *Microbial Drug Resistance*.

— **Pedro García González**

Miembro de las Juntas Directivas de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) y de la Sociedad Española de Virología (SEV).

— **Francisco Javier Medina Díaz**

Miembro del Consejo Editorial del *Journal of Applied Medicin*, 2002.

— **Susana Moreno Díaz de la Espina**

Nombramiento como Miembro del Comité Científico Internacional permanente del *International Nuclear Workshop*. Septiembre, 2001.

Miembro del Comité Científico Asesor del CSIC. Hasta XI 2001.

Miembro de la Comisión de Área de Biología y Biomedicina del CSIC. Hasta XI 2001).

Premio científico del Ministerio del Azúcar de Cuba en la categoría Mejor Trabajo Científico, 2001. Al grupo de investigación dirigido por la Dra. S. Moreno Díaz de la Espina, incluye a la Dra. M.E. Fernández Gómez, Dra. C. De la Torre, Dr. R. Acevedo y Dra. M.A. Cuadrado, 2001.

Premio Anual 2001 de la Cátedra Alvaro Reinoso de la Universidad de la Habana. Al grupo de investigación dirigido por la Dra. S. Moreno Díaz de la Espina, incluye a la Dra. M.E. Fernández Gómez, Dra. C. De la Torre, Dr. R. Acevedo y Dra. M.A. Cuadrado, 2001.

— **Eduardo Páez Abril**

Miembro del Consejo Editorial de la revista *Virología* (publicación oficial de la S.E.V.).

Miembro del Comité de Redacción de la Revista Oficial de la Sociedad Española de Virología.

Miembro de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Virología.

Miembro del Comité Científico del VII Congreso Nacional de Virología. Valencia.

— **Roberto Parrilla Sánchez**

Representante institucional (CSIC) en el *Standing Committee de Medicina de la European Science Foundation*.

— **Miguel Ángel Peñalva Soto**

Miembro electo de EMBO desde el año 2001.

— **Sara Isabel Pérez Priteo**

Elegida como Secretaria Científica de la Sociedad Española de Microbiología (2001-2005).

— **M^a Carmen Risueño Almeida**

Presidente electa de la Sociedad Española de Biología Celular (SEBC). Desde Mayo 2001.

Miembro del Editorial Board del *Journal of Plant Physiology*, in affiliation with the FESPP. Desde 2001.

Vocal de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Biología del Desarrollo (SEBD). Desde 2001.

Miembro del Comité de Evaluación de Proyectos: *Plant Biology Evaluation Panel* de la NASA, Washington, USA.

Vocal de la Junta Directiva de la Rama Española de la ETCS (*European Tissue Culture Society*)

Medalla de la 1st. *Faculty of Medicine of Charles University* de Praga, República Checa, 2002.

— **José María Saugar, Alarcón, T., Chivas, C., López-Brea, M., Andreu, D., y Luis Rivas**

Premio a la mejor comunicación en el X Congreso de la Sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología Clínica. Sevilla, 2002.

Organización de Congresos y Cursos

Organization of Congresses and Coursers

— **José Antonio Abrisqueta Zarrabe**

Mesa Redonda sobre Ética y Genética. Auditorio "Príncipe Felipe" de Oviedo. Patrocinada por el Real Patronato sobre Discapacidad, 2001.

— **Ángela Casado Moragón**

Curso de Titulación propia: "Técnicas Inmunohematológicas y Electroforéticas aplicables al tejido sanguíneo humano". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. Junio-Julio, 2001.

Curso de Doctorado en Geriatría: "Radicales Libres y Envejecimiento". Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Mayo, 2002.

Curso de Titulación propia: "Técnicas Inmunohematológicas y Electroforéticas aplicables al tejido sanguíneo humano". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. Junio-Julio, 2002.

Primeras Jornadas sobre Nuevas Perspectivas en el Cuidado de la Salud. Foro Anual de Salud. Granada, Noviembre, 2002.

— **Flora de Pablo**

Curso de la Universidad Internacional Menéndez Pelayo. "La Ciencia y su contexto social" (Co-organizadora). Valencia. Octubre, 2002.

— **Consuelo de la Torre García-Quintana**

Miembro del Comité Organizador *Internacional del Wilhem Bernhard's Workshop. 17th International Workshop on the Cell Nucleus*. Arcachon, Francia. Septiembre, 2001.

— **José Ramón Díaz-Ruiz Alba**

Coordinador Curso de Doctorado y Especialización "Virus Patógenos de Plantas". Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Departamentos de Biología Vegetal y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Catálogo Cursos para Postgraduados. Departamento de Postgrado y Especialización, CSIC pp. 21-23, 2001.

— **Manuel Espinosa Padrón**

Seminario. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. "Replicación y transferencia del plásmido pMV158". Mayo, 2001. Organizador del Curso de doctorado conjunto entre el Centro de Investigaciones Biológicas y la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. Santander. Mayo, 2001.

Organizador del Curso de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. "Biología Molecular de Procariontas". 21 de Mayo a 1 de Junio de 2001.

Seminario. Institut de Biologie et de Médecine Moléculaire de la Universidad Libre de Bruselas. "What the promiscuous plasmids show us". Mayo, 2002.

Organizador del Curso de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. "Biología Molecular de Procariontas". 20 a 31 de Mayo 2002.

Seminario. *National Institute of Health (USA)*. "Plasmid pMV158: what has it taught us these years". Junio, 2002.

— **Gonzalo Giménez Martín**

Miembro del Comité Internacional del VIII Congreso Iberoamericano de Biología Celular. Lima, Perú. Septiembre, 2001.

— **Aldo González Becerra**

Participación en la puesta en marcha y construcción del Centro de Biotecnología en la Universidad de Concepción, Chile. Mítines y reuniones con científicos y personas de la administración española, iniciado en junio de 2001.

— **Santiago Lamas**

Workshop on Regulation of protein function by Nitric Oxide. Fundación Juan March. Mayo, 2001.

— **Susana Moreno Díaz de la Espina**

Comité Científico Internacional Organizador del XVIII International Nuclear Workshop. Pavia. Desde el año 2002.

— **Roberto Parrilla Sánchez**

Coorganizador del curso de doctorado sobre Medicina Molecular impartido en la Universidad de Santiago de Chile bajo el patrocinio del Banco Santander y el CSIC.

— **Miguel Ángel Peñalva Soto**

New EMBO Members Workshop: Frontiers in Molecular Biology. Alkaptonuria: one century of human (and fungal) Genetics. Heraklion, Creta. Octubre, 2001.

Invited speaker. Juan March meeting on Stress in Yeast Cell Biology and Beyond Regulation of gene expression by ambient pH. Madrid. Enero, 2002.

Session chairman (organizer) and invited speaker, Gordon Research Conference on Cellular and Molecular Microbiology pH regulation in fungi and yeasts. Holderness School, NH, USA. Junio, 2002.

— **Juan M. Ramírez de Verger**

"Procesos fotosintéticos primarios: absorción de luz y transferencia de cargas", Ponencia invitada al VIII Congreso Luso Español de Biofísica, Puerto de la Cruz. Julio, 2002.

— **M^a Carmen Risueño Almeida**

Curso Internacional de Formación de Formadores patrocinado por la Agencia Española de Cooperación Internacional, AECI, y el INIA, "Herramientas Biotecnológicas aplicadas a especies de Interés Agroforestal Cartagena de Indias, Colombia. Abril, 2002. Miembro del Comité Organizador del 43th International Meeting of the European Tissue Culture Society: Cell Interactions and Cellular Complexity, Granada. Septiembre, 2001.

Organizadora del *Workshop Plant Tissue Cultures, dentro del 43th International Meeting of the European Tissue Culture Society: Cell Interactions and Cellular Complexity, Granada. Septiembre, 2001.*

Organizadora del Tutorial *Confocal Microscopy, dentro del 43th International Meeting of the European Tissue Culture Society: Cell Interactions and Cellular Complexity, Granada. Septiembre, 2001.*

— **M^a Carmen Risueño Almeida y Pilar S. Testillano**

Symposium satélite al Congreso Internacional Microscopy patrocinado por SEBC, SEM y ETCS. "Cryomethods for In Situ Molecular Identification", Barcelona. Septiembre, 2001.

— **Sylvia Rodríguez Saint-Jean**

Experta invitada en el Curso Internacional de Patología en Acuicultura, y Reunion Internacional de Calidad Alimentaria en la producción trufícola. Universidad Autónoma de México, Toluca, México. Octubre 2002.

— **Pilar Sánchez Testillano**

Curso Internacional de Formación de Formadores patrocinado por la Agencia Española de Cooperación Internacional, AECL, y el INIA. “Cultivo in Vitro de Tejidos en Especies de Interés Agroforestal” Antigua, Guatemala. Junio, 2001.

Aula de Seminarios

Seminars

Coordinador: Dr. Felix Ortego
Secretaría: M^a Victoria Lafita

2001

Prof. Juan Luis Tamargo
Director del Instituto de Farmacología y Toxicología
Bloqueantes de Canales de Potasio

Dra. María Gasset
Instituto Química Física, Rocasolano
Los priones. Una nueva clase de patógenos. ¿Qué sabemos, qué desconocemos?

Dr. Harald Brüssow
Nestlé Research Centre, Nestec Ltd., Lausanne, Suiza
Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages. What is the relevance for the agro-food industry?

Dr. Masashi Suzuki
AIST-NIBHT Crest, Centre of Structural Biology, Japón
Analysis of archaeal genomes based on nucleotide sequence and molecular structure

Dr. Paul Christou
Molecular Biotechnology Unit, John Innes Centre, Norwich, United Kingdom
Third generation outputs of plant biotechnology-From fundamental science to application

Dr. Simón Santa Cruz
Horticulture Research International, East Malling West Malling, Kent, UK
The hypersensitive response: how similar to apoptosis?

Dr. Jonathan Stamler
Howard Huges Medical Institute, Duke University
S-nitrosylation of proteins: structural and biological studies

Dr. Alfredo Berzal
Instituto de Parasitología López Neyra, CSIC, Granada
Inactivación génica mediada por RNA: ingeniería de ribozimas

Dr. Filippo Giancotti

Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA

Integrin signaling and cell cycle control

Dr. Jordi García Fernández

Departament de Genètica, Facultat Biologia – Principal, Barcelona

Evo-Devo: duplicación génica, el anfibio y el origen de los vertebrados

Dr. Ronald Berezney

Department. of Biological Sciences, SUNY at Buffalo, Buffalo, NY

Connecting Nuclear Architecture and Genomic Function in the Cell Nucleus

Dr. Francisco Xavier Gomis Rùth

Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC

Proteínas de control plasmídico: de mini a maxi

Dr. Francisco Palau.

Laboratori de genètica i medicina molecular. Instituto de Biomedicina. CSIC. VALENCIA

Modelo en Caenorhabditis elegans de la ataxia de Friedreich

Dr. Arun Seth

Department of Molecular Pathology, Sunnybrook and Women's College Health Science Center, University of Toronto, Toronto, Canada

Ets transcription factors in bone development

Prof. Roberto Kolter

Microbiology and Molecular Genetics, Harvard medical School, Boston, USA

Desarrollo de biofilms bacterianos y la evolución de la patogénesis

Dr. Dhruba Chattoraj

Lab of Biochemistry, NCI, NIH, (Bethesda, USA).

Transcriptional regulation of an autorepressed gene

Prof. Conly L. Rieder

Division of Molecular Medicine, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, N.Y.

The role of the Centrosome in the Cell Cycle and Mitosis in Vertebrates

Prof. Paul Bray

Professor of Medicine, Chief, Thrombosis Research Section, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

Platelet hyperreactivity and myocardial infarction

Dr. Antoni Matilla

Institute of Child Health, University College London, London, UK

Investigación de los mecanismos moleculares de neurodegeneración en las ataxias espinocerebelosas. Sobre expansiones de poliglutaminas, inclusiones intranucleares y proteasomas

Dr. Balbino Alarcón

Centro de Biología Molecular, Madrid

Iniciación de la cascada de señalización por el receptor para antígeno de linfocitos T: evidencia de un cambio conformacional

Dr. Dennis Bray

Department of Zoology, University of Cambridge, UK

Molecular Events in a Small Volume of Cytoplasm

Dr. B. Fenton

Department of Soft Fruit and Perennial Crops, Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, UK

*Clonal variation in *Myzus persicae*; a molecular and biological analysis*

Dr. Xosé Bustelo

Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca

Vías de activación y señalización de las oncoproteínas Vav

Dr. Ivan Raska

Dept. Cell Biology, Inst. Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic. Laboratory of Gene Expression, 1st Faculty of Medicine, Charles University Prague

*DNA double strand breaks induce formation of RP-A/Ku foci on in vitro reconstituted *Xenopus* sperm nuclei*

Prof. W.S. Bowers

Lab. Chemical Ecology, Dept. Entomology, The University of Arizona, Tucson, Arizona, USA

Lessons from nature show the way to environmentally pacific pest control strategies

Dr. Marco Biggiogera

Lab. Biologia Cellulare, Dept. Biologia Animale, Università di Pavia, Italia

Heterogeneous RNP-Derived Structures (HERDS) as markers of transcriptional arrest: the search for the point of no return

Dr. Manuel. M. Nieto

Dept. Plasticidad Neural, Instituto de Neurobiología Ramón y Cajal, CSIC, Madrid

Reparación funcional de aferentes sensoriales a la médula espinal: evidencia multidisciplinar

Dr. Antonio Fernández-Tiburcio

Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona

Poliaminas: localización, organización y efectos de la sobreexpresión de enzimas biosintéticos

Dr. Francisco Sánchez Madrid

Sección de Inmunología, Hospital de La Princesa, Madrid

Polaridad celular: Relevancia en migración leucocitaria e interacciones inmunes

Dr. Moshe Yaniv

Instituto Pasteur, Paris, Francia

The HNF1 homeoproteins in development and disease

Dra. Josette Rouvière-Yaniv

Institut de Biologie Physico Chimique, Laboratoire de Physiologie Bacterienne, CNRS UPR 9073, Paris, Francia

By binding to DNA and RNA, HU fullfills multiple functions in E. coli

Dr. Pablo García de Frutos

Lab. Investigaciones Biomédicas, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

Papel de las proteínas dependientes de vitamina K en la enfermedad aterotrombótica

Dr. José M^a de Pereda

The Burnham Institute, La Jolla, California, USA

Base estructural de la activación de integrinas por talina

2002

Dra. Eva Nogales

Howard Hughes Medical Institute, Molecular and Cell Biology Departamento, University of California, Berkeley, USA

Caracterización estructural de complejos de transcripción humanos

Dr. Miguel Angel Alonso

CBM, CSIC, Madrid

La familia MAL de proteínas como maquinaria para los procesos de tráfico de membranas y señalización celular mediados por balsas lipídicas (rafts)

Dr. Peter E. Bryant

School of Biology, University of St. Andrews, St. Andrews, UK

Molecular mechanisms of radiation-induced chromatid breakage and its possible importance for cancer susceptibility

Prof. Manuel N. Fernández

Hospital Clínica Puerta de Hierro, Facultad de Medicina, Univ. Autónoma Madrid, Spain

Sangre de Cordón Umbilical como fuente de células progenitoras para trasplante

Dr. José Miguel Rodríguez Frade

Departamento de Inmunología y Oncología, CNB

Nuevos aspectos en la señalización de las quimioquinas: dimerización de sus receptores

Dr. Oscar Llorca

Institute of Cancer Research, Chester Beatty Laboratories, Londres

Estructura 3d de la proteína detectora de roturas del DNA, la Kinasa ATM

Joaquín Madrenas, M.D., Ph.D.

The John P. Robarts Research Institute, The University of Western Ontario, Canada

Nueva actividad coestimuladora asociada a la Fosfodiesterasa 4B2 en linfocitos T

Dr. Klaus Piontek

ETH-Zentrum, Swis Federal Institute of Technology, Zurich) C/ Universitaetstr, Zurich, Suiza

Structure and function of ligninolytic peroxidases and laccases

Dr. Daniela Rhodes, Rafa Giraldo,

MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK

Human Telomere Structure , rhodes@mrc-lmb.cam.ac.uk

Prof. Ginés Morata Pérez

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa CSIC- Univ. Autónoma, Madrid

Control del tamaño del ala de Drosophila: Dpp, competición celular y apoptosis

Dr. Javier Martínez-Botas

Department of Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

Cómo mantener la línea comiendo de todo y sin hacer ejercicio

Prof. Roberto Marco

Departamento de Bioquímica UAM e Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC-UAM), Madrid

Pasado, Presente y Futuro de la Biología del desarrollo en el Espacio. Desafíos y Problemas de la Colonización fuera de la Tierra

Dr. Allen P. Minton

NIH, Bethesda, MD, USA

Quantitative studies of the effect of macromolecular crowding upon the energetics of DNA-protein interactions

Prof. S. Busby

School of Biosciences, The University of Birmingham, Birmingham, UK

Transcription activation at simple and complex bacterial promoters.

Prof. Venki Ramakrishnan

MRC Laboratory of Molecular Biology

Decoding the message: How the ribosome selects tRNA

Dr. Soichi Kojima

Laboratory of Molecular Cell Sciences, Instituto Riken Wako, Saitama, Japón

Role of Sp1 transcription factor pathway in Cancer, Vascular and Hepatic diseases

Prof. Rafael Radi

Facultad de Medicina, Universidad de Uruguay, Montevideo, Uruguay

Reactividad y difusión de peroxinitrito en sistemas biológicos

Dr. Cesar Llave

Center for Gene Research and Biotechnology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA

Endogenous small RNAs in plants: new perspectives on gene regulation

Dra. Sui Huang, S. Moreno

Department of Cell and Molecular Biology, Northwestern University Medical School, CHICAGO, USA

Intra-nuclear Dynamics in Living Cells

Dr. Félix Claverie-Martín

Hospital de La Candelaria (Tenerife) Servicio Canario de Salud

Mutaciones en canales de cloro CIC asociadas con tubulopatías renales

Victor L. Ruiz-Perez, Ph.D.

The Institute of Human Genetics, University of Newcastle upon Tyne, The International Centre for Life, Newcastle upon Tyne, UK

El síndrome de Ellis-van Creveld: Un caso de genes adyacentes con transcripción divergente

Dr. Jan Lowe

Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council, Hills Road, Cambridge, UK

Actin-like proteins in bacteria

Dirección



Dirección

Director: JUAN M. RAMÍREZ DE VEGER LOBO (Hasta V-2002)
GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO (Desde V-2002)

Vicedirectores: M^a ELENA FERNÁNDEZ-TRESGUERRES
RODRÍGUEZ-VIGIL (Hasta V-2002)
PABLO HERNÁNDEZ VALENZUELA (Hasta V-2002)
ANGEL TOMÁS MARTÍNEZ FERRER (Hasta V-2002)

PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ (Desde V-2002)
AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ (Desde V-2002)

Secretaría: ANA CHAO VÁZQUEZ

Gerencia

Gerente: GERMÁN LERMA RODRIGO

LUIS GARCÍA TRUJILLO
RAQUEL SÁNCHEZ GARCÍA

Administración

Administrador: ANGEL ABRIL NOVELLA

JULIA ANADES BESNARD
CONCEPCIÓN CHORRO DE VILLACEBALLOS
FCO. JAVIER DE LA FLOR HERNÁNDEZ
ESTRELLA GONZÁLEZ HERRADURA
NIEVES GONZÁLEZ ESTEBAN

Personal: MANUEL MOLINA MORENTE

Compras y Almacén

Jefe de Compras y Almacén: RAMÓN SERRANO CORONADO

ELISA BALLESTEROS VILLAMAYOR
MARGARITA FERNÁNDEZ GARCÍA
M^a DOLORES MUÑOZ AHUQUILLO
JOSÉ MANUEL PÉREZ CABRIA
M^a TERESA RAMOS JIMÉNEZ
FRANCISCO SERRANO CORONADO



Servicios Generales

Conserjería

DIEGO GARCÍA HERRANZ
LUCÍA GONZÁLEZ DÍAZ
CELIA LÓPEZ ADSUARA
M^o DE LOS MILAGROS RODRÍGUEZ BUENO

Limpieza de Material y Lavandería

BLASA CARRIÓN FERNÁNDEZ
SARA FUENTES ROMERO
FELICIDAD LARA MARTÍNEZ
CARMEN LÓPEZ CASTELLANOS
M^a JOSÉ LÓPEZ FABREGAT
MARÍA LÓPEZ ROMERA
FRANCISCA MORANTE GONZÁLEZ
SOLEDAD PASTOR ENCABO

Comedor

BEATRIZ FRAILE FERNÁNDEZ
ANGELA MUÑOZ ALONSO
DOLORES PORTERO LAULA
ENCARNACIÓN SÁNCHEZ RUIZ
FELINA SOMOLINOS GARCÍA

Franqueo

JOSÉ MANUEL GORDILLO RODRÍGUEZ

Vigilancia

LORENZO MONTERO VERA
ANTONIO MORENO CALLE
DOMINGO MURIEL MUÑOZ

Servicio Técnico

Jefe Serv. Técnico: ANTONIO MANUEL J. GARCÍA ALVAREZ

LORENZO ALONSO MACARRÓN
 ÁNGEL ARRANZ BOMBÍN
 ALEJANDRO AYUDA PASCUAL
 ALEJANDRO DAVID CABAÑAS LÓPEZ
 JOSÉ CABAÑAS OLIVARES
 ÁNGEL GUERRERO RIVERO
 M^a JOSÉ HERNÁNDEZ PARADELO
 JOSÉ M^a MELGUIZO SOLIER
 ANTONIO PÉREZ PARDO
 JUAN MIGUEL TIJERO PÁRAMO
 MANUEL RAMÓN TORO MONSALVE
 ANTONIO VALLEJO DOMÍNGUEZ
 PALOMA VELASCO DE LA ROCA
 IKER VELÁSQUEZ AZA

Delineación

AURELIO HURTADO CARO

Fotografía

MÓNICA M^a FONTELA LAGO
 VICTORIA MUÑOZ MARTÍN

Informática

JOSÉ MANUEL ANGULO ZAPATERO
 JOSÉ RAMÓN DÍEZ BUENO

Aplicaciones Informáticas

Responsable Científico: DR. ANTONIO ROMERO
 DR. FCO. JAVIER MEDINA

MARIO GARCÍA LACOPA

Servicios Especiales

Microscopía electrónica

Responsable Científico: DRA. CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA

M^a DOLORES GUIRAO REY
 JASMINKA BOSCOVICK

Durante el bienio 2001-2002 el Servicio de Microscopía Electrónica del CIB (SME) ha continuado utilizando sus equipos realizando una microscopía electrónica convencional, hasta su traslado al nuevo Centro donde, gracias al Microscopio Electrónico Jeol 1230 y sus accesorios complementarios, se introducirán ciertas técnicas moleculares.

Además del CIB, han utilizado el SME los Institutos Rocasolano y Torroja, y el CIEMAT, habiéndose alcanzado 340 h de utilización del Microscopio Philips 300, con 2021 placas fotográficas impresionadas, 91 preparaciones de muestras con los correspondientes cortes ultrafinos, 37 preparaciones mediante criosustitución y 24 sombreados con carbón.

During the last two years 2001 and 2002 the Electron Microscope Service (SME) of the CIB has continued using its equipment to give conventional electron microscope studies until its transfer to the new Center where, by means of the Jeol 1230 Electron Microscope plus its complementary equipment, certain molecular techniques will be introduced.

Not only the CIB has utilized the SME but also the Rocasolano and Torroja Institutes and the CIEMAT, having reached 340 h of Philips 300 Microscope observation, 2021 exposed photographic plates, 91 processing of samples with the corresponding ultrathin sections, 37 cryosubstitution samples and 24 carbon shadowed samples.



Animalario

Responsable Científico: DR. JOSÉ M^º ROJO HERNÁNDEZ

ISABEL CHICO CALERO
GABINO GARCÍA AMAYA
FRANCISCO JOSÉ GARCÍA GONZÁLEZ
MANUEL MORENO CALLE
SUSANA SERNA MARTÍNEZ
ISABEL TORRES VIDAL

Cromatografía

Responsable Científico: DR. JUAN ANTONIO LEAL OJEADA

ALICIA PRIETO ORZANCO

El Servicio de cromatografía dispone de:

Dos cromatógrafos de gases con detector de ionización de llama (Perkin-Elmer), y un cromatógrafo de gases con detector de masas (GC-MS) (Perkin-Elmer).

Las muestras analizadas proceden principalmente de grupos del propio Centro. Los cromatógrafos de gases se emplean para la detección rutinaria de compuestos mediante la simple comparación de los tiempos de retención de los analitos con los de sustancias patrón, y el sistema GC-MS para la detección e identificación de sustancias mediante el espectro de masas de los compuestos previamente separados en el cromatógrafo de gases.

Por otra parte, se dispone de un equipo de espectrometría de masas de MALDI-TOF Biflex III (Bruker), en el que se analizan muestras tanto de grupos del CIB como ajenos a él. Este instrumento permite determinar la masa molecular de diversas sustancias tanto biológicas (proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos...) como sintéticas, detección de modificaciones que afecten a la masa de dichas sustancias, análisis de la mezcla de péptidos obtenidos mediante la digestión enzimática de proteínas completas (huella peptídica), etc.

The following instruments are available at the Chromatography facility:

Two gas chromatographs with flame ionisation detector (Perkin-Elmer), and one gas chromatography-mass spectrometry system (GC-MS) (Perkin-Elmer).

The samples analysed arise mainly from CIB groups. Gas chromatographs are used for the routine detection of analytes through comparison of their retention times with those found for standards, and the GC-MS system is utilised for the detection and identification (by means of their mass spectrum) of compounds previously separated by gas chromatography.

A MALDI-TOF Biflex III (Bruker) instrument is also available for analysing samples from CIB and any other institution. The instrument allows molecular mass determination of biological (proteins, nucleic acids, oligosaccharides...) and synthetic substances, detection of modifications affecting the mass of such compounds, analysis of the peptide mix generated by enzymatic hydrolysis of a given protein, etc.

Espectroscopia

Responsable Científico:

DR. JUAN MANUEL RAMÍREZ DE VERGER

Cultivo de Células Animales

Responsable Científico:

DR. AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ

BLANCA PÉREZ MACEDA

M^a ESTHER MIGUEL GÓMEZ

El banco de Células Humanas y Animales

En la actualidad consta de 70 líneas Cell Nank.xls, incluyendo 17 hibridomas, de origen conocido y libres de micoplasmas. En los últimos años se han incorporado 10 nuevas líneas celulares.

Este Banco se encuentra a disposición de la comunidad científica, pudiendo solicitar las células cuando así se precise. Las células se entregan bien en cultivo en frasco de 25 cm² ó bien directamente congeladas en un criovial.

Detección y Eliminación de micoplasmas

El servicio lleva a cabo:

-La detección de micoplasmas en líneas celulares y medios de cultivo mediante tinción DNA-Hoechst utilizando la línea celular Vero como indicadora.

-La curación de los cultivos contaminados con micoplasmas, mediante tratamiento con diferentes antibióticos específicos. Éste es un procedimiento lento y que no siempre se puede garantizar. En los dos últimos años se han tratado un total de 11 líneas celulares contaminadas con micoplasmas, todas ellas curadas con éxito.

Selección de Suero Fetal Bovino

El Suero Fetal Bovino presenta variaciones tanto entre los distintos proveedores como entre lotes del mismo proveedor.

El Servicio selecciona un lote/es de SFB, que se ofrece como reserva general del CB a aquellos grupos que quieran utilizar el mismo lote que utiliza este laboratorio. Actualmente tenemos dos lotes reservados de diferentes distribuidores. La duración de esta reserva se calcula en un período entre 18 a 24 meses.

The Animal Cell Culture laboratory of the CIB offers the following activities:

The Human and Animal Cell Bank

It is a collection that actually is composed by 70 cell lines Cell Bank.xls, including 17 hybridomas, of know origin and free of mycoplasmas. The last two years we have incorporated 10 new cell lines.

This human and animal cell collection has been established to make the cells available to the scientific community. The cell lines can be supplied as a growing culture in a 25 cm² culture flask or in a frozen vial.

Mycoplasma Testing and Elimination

Cell lines and culture media can be tested for mycoplasma contamination by Hoechst DNA stain using Vero cells as indicators.

Should your cell lines prove to be contaminated with mycoplasma the this laboratory offers an elimination service to cure them with specific antibiotics. This is a very lengthy procedure and not always can be guaranteed as it depends on how much resistance is built up by the particular mycoplasma contaminants. The last two years we have treated 11 mycoplasma contaminated cell lines successfully.

Fetal Bovine Serum Selection

Fetal Bovine Serum can demonstrate significant variation between different suppliers and also between different batches from the same supplier. The Animal Cell Culture Department selects a general batch/es of FBS and offers the facility for the research

community of CIB to use the same reserved serum batch as we use. Now we have selected two different batches from two different suppliers. The reserved batch has a duration of 18 to 24 months.

Química de Proteínas

Responsable Científico:

PROF. GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO

JOSÉ JAVIER VARELA ESPINOSA
EMILIA APORTA SOSA

Citometría de Flujo

Responsable Científico:

DR. AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ

PEDRO LASTRES VARO
M^a JOSÉ SAIZ SORIANO

Esterilización

Responsable Científico:

DR. JUAN ANTONIO LEAL OJEDA

ROSA DÍAZ LÓPEZ
VIRGINIA QUESADA GUERRERO
M^a TERESA SEISDEDOS DOMÍNGUEZ

Microscopía Confocal

Responsable Científico:

DRA. M^a DEL CARMEN RISUEÑO ALMEIDA

M^a ANGELES OLLACARIZQUETA DONAZAR

INFORME DE ACTIVIDAD DURANTE LOS AÑOS 2001- 2002

Este servicio ha proporcionado actividad y resultados a 38 grupos de investigación de éste y de otros centros públicos. Los bloques utilizados por los usuarios son: en el caso del confocal 1244 y en el equipo de microscopía de fluorescencia con cámara CCD 1025, de dos horas cada bloque. Las imágenes obtenidas se envían por la red del Centro a cada laboratorio o bien copiadas en cd.

Se ha hecho un estudio pormenorizado de las ofertas de equipos modernos de microscopía confocal, siempre en contacto con los usuarios y teniendo en cuenta las necesidades de cada grupo de este Centro. Cada casa comercial hizo una exposición detalla-

da de sus equipos y aplicaciones de los mismos ante el conjunto de los usuarios y demostraciones prácticas, con muestras proporcionadas por dichos usuarios hasta conseguir una elección apropiada. Casi se consiguió unanimidad con el Leica TCS SP2 provisto de 9 líneas de laser y sistemas AOTF y AOBS, en definitiva el último modelo. El nuevo equipo de microscopía confocal ya se encuentra instalado en el nuevo centro del CIB y su funcionamiento y resultados son altamente satisfactorios. La negociación fue dura y se consiguieron las mejores condiciones de tiempo de garantía y atención técnica. Cursos de formación. Para el responsable Técnico del Servicio, Teórico-Práctico para los usuarios del Equipo y de Mantenimiento Preventivo para los Técnicos del Centro para poder llevar a cabo algunas tareas de mantenimiento, de forma que el contrato de mantenimiento, a partir del 2006 tenga un coste más reducido. Asimismo, cursos de aplicaciones sobre las amplias prestaciones del equipo.

El número de alícuotas de fluorocromos proporcionadas por este servicio a los usuarios sobrepasa el centenar. Se puede considerar que los precios abonados, son ventajosos para los usuarios y apropiados para el Servicio, al cubrirse los gastos por este concepto. Se realizó gran número de impresiones de imágenes de alta calidad y se sigue proporcionando papel de impresión de diversas clases a los miembros del CIB, usuarios o no.

Ultracentrifugación Analítica

Responsable Científico:

DR. GERMÁN RIVAS CABALLERO

CARLOS ALFONSO BOTELLO

La ultracentrifugación analítica moderna consiste en un importante conjunto de métodos únicos que permiten la determinación del tamaño y la forma aproximada de macromoléculas biológicas en disolución, y, principalmente, la detección y análisis cuantitativo (estequiometría, afinidad y esquema de asociación) de asociaciones macromoleculares en disolución (incluyendo interacciones proteína-proteína, DNA- proteína y receptor- ligando).

Desde 1994 el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) posee una ultracentrífuga analítica de nueva generación con sistema de detección UV-VIS. El CIB adquirió en 2002 una segunda ultracentrífuga analítica que cuenta con un sistema adicional de detección mediante interferencia que permite el estudio de muestras en disoluciones con alta absorción en el UV-VIS. Además, el CIB posee tecnologías complementarias (biosensor óptico, espectroscopía de fluorescencia, dicroísmo circular, microscopía electrónica, etc.) para el abordaje integral de interacciones macromoleculares en disolución, con todos los conocimientos y experiencia necesarias, y además con la colaboración de expertos internacionales en el tema. Durante estos años el Servicio de Ultracentrifugación Analítica del CIB ha dado apoyo científico-técnico a un considerable número de grupos de investigación tanto del CIB, como de otros centros del CSIC, así como de departamentos universitarios y otros centros de investigación.

Modern analytical ultracentrifugation is an important group of unique methods which allow the determination of the size and approximate shape of biological macromolecules in solution, and, mainly, the detection and quantitative analysis (stoichiometry, affinity and association scheme) of macromolecular associations in solution (including protein-protein, DNA-protein, and receptor-ligand interactions).

Since 1994 the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) has a modern analytical ultracentrifuge with UV-VIS optical detection system. In 2002, the CIB got a second analytical ultracentrifuge which has an additional detection system (interference) that allows the study of systems in solutions with a high absorption in the UV-VIS. The CIB has complementary technologies (optical biosensor, fluorescence spectroscopy, circular dichroism, electron microscopy, etc.) for the integral approach of macromolecular

interactions in solution, with the required knowledge and expertise, and with the advice of international experts in the field. Since its establishment at CIB, the Analytical Ultracentrifugation Facility has given technical and scientific advice and support to a considerable number of research groups of CIB, other CSIC institutes, as well as university departments and research centers.

Secuenciación Automática de DNA

Responsable Científico: DR. SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA Y
DR. JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ

Carmen Albo Castellanos

SONIA CARBAJO GARCÍA
M^a LUISA CAYUELA DE PEDRO
ASUNCIÓN DÍAZ CARRASCO
M^a GRACIA PORRAS FRANCO

Protección Radiológica

Responsable Científico: DRA. M^a LUISA BOTELLA

MARTA CEBRIÁN ECHARRI
M^a DEL CARMEN DOÑORO VÁZQUEZ

Trámites relacionados con Organismos oficiales.- CAM: Autorización de la instalación radiactiva del CIB en Ramiro de Maeztu. CSN: 4 permisos especiales para la utilización de zonas no autorizadas, autorización de un nuevo laboratorio de utilización esporádica, remisión de 2 informes anuales. El CSN ha realizado dos inspecciones de la instalación radiactiva sin encontrar desviaciones.

Control de personal.- Formadas en protección radiológica y dadas de alta 49 personas, historiales dosimétricos y bajas de 60 personas. El año 2001 se gestionó el reconocimiento médico de 173 personas. Actualmente hay 141 trabajadores dados de alta como profesionalmente expuestos, 3 Licencias de Supervisor y 32 de Operador. Control dosimétrico mensual.

Control de laboratorios autorizados.- Alta de 2 nuevos laboratorios (uno para uso esporádico) y baja de 11. Actualmente hay autorizados 17 laboratorios, dos zonas de uso esporádico, un equipo de Rayos X y un difractor. Controles periódicos de contaminación/radiación.

Control de material radiactivo.- Se han recibido 198 mCi de distintos compuestos marcados radiactivamente con 32P, 35S, 14C, 3H ó 125I. Alcuotas utilizadas en los laboratorios: 952 y en la cámara caliente: 385. Residuos evacuados: 2025 litros de sólidos y 860 litros de líquidos.

Official Organisms relationship.- CAM: Authorization of Radioactive installation in Ramiro de Maeztu. CSN: Four special permissions to work in non radioactive areas, authorization of a new laboratory for sporadic use, two annual reports sent, two inspection of the radioactive installation were successfully passed.

Control of exposed people.- 49 persons were incorporated like professional exposed workers and received radiological protection education. 60 persons left radioactive handling and their dosimetric historials were done. 173 medical checks were managed during the year 2001. At this moment, there are 141 professional exposed workers, 3 Supervisor and 32 Operator Licences. Dosimetric control were monthly done.

Authorized laboratories.- Eleven laboratories were closed for radioactive handling and two were authorized (one for sporadic use). At this moment, there are 17 authorized laboratories, an X-ray equipment and a diffractometer. Contamination and radiation controls were periodically done.

Radioactive material control.- 198 mCi of different radioactive labelled compounds (with ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , 3H o ^{125}I) were received. 952 aliquots were used in the laboratories and 385 in the hot-room. 2025 liters of solid radioactive waste and 860 of liquids were evacuated.

Biblioteca

Responsable Científico:

DR. PABLO HERNÁNDEZ
EVENCIO CABRERIZO DE LAS HERAS
M^a OLVIDO PARTEARROYO LACABA
M^a ANGELES SACRISTÁN MARTÍN
M^a TERESA SILIÓ MARTÍNEZ
JOSÉ MIGUEL SOTO ESTEBANEZ
M^a JESÚS VILELA MANRIQUE

Reprografía

M^a JESÚS GARABITO SECO

La Biblioteca del CIB, integrada en la Red de Bibliotecas del CSIC, está especializada en Biología, Biomedicina y Bioquímica. Cuenta con una excelente recopilación de revistas y otras publicaciones seriadas (1.285 títulos), de las cuales 381 están vivas, y monografías (7.720 volúmenes). Estos fondos se actualizan anualmente con las adquisiciones que decide una Comisión constituida por investigadores de los seis departamentos del CIB, después de evaluar las novedades bibliográficas, incrementándose en el periodo 2001-2002 en 259 monografías y títulos de serie y 19 revistas, bien por suscripción, donación o intercambio. La mayoría de estas publicaciones se adquiere por concurso público del CSIC a través de diferentes distribuidores, destacando en este último periodo el elevado aumento de suscripciones electrónicas. Estas publicaciones están disponibles para los investigadores del CIB y del CSIC en la página web de la biblioteca, que cuenta con una lista regularmente revisada de revistas, libros electrónicos y bases de datos. Asimismo se han aumentado en dicha web los enlaces a catálogos bibliográficos de centros universitarios, sanitarios y tecnológicos nacionales e internacionales, así como a diversas publicaciones gratuitas, lo que ha mejorado el servicio de documentación y de búsqueda bibliográfica informatizada.

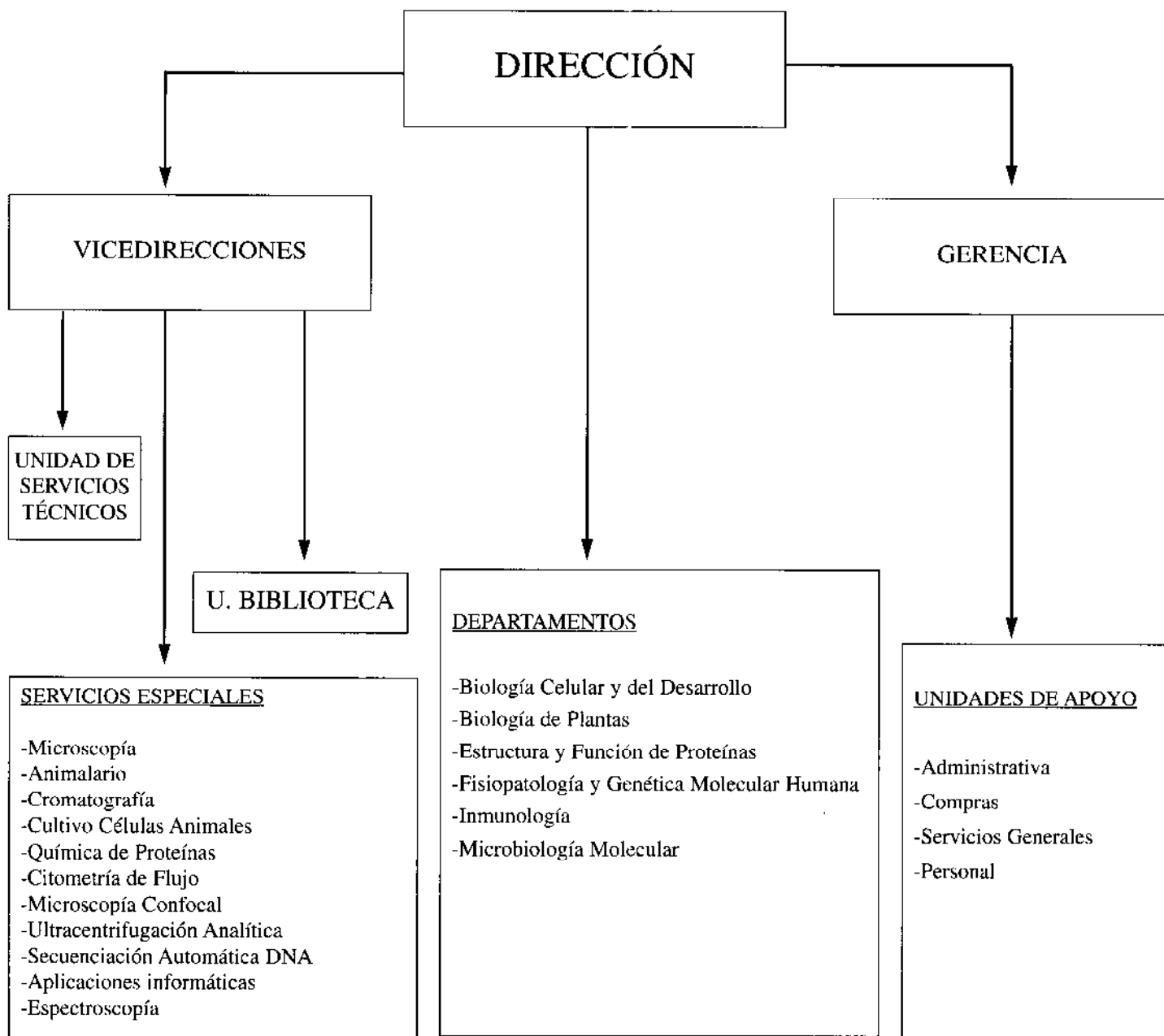
El préstamo interbibliotecario se ha visto agilizado por la total informatización del Programa de Gestión de Bibliotecas del CSIC. Nuestra biblioteca sigue estando a la cabeza de las bibliotecas del CSIC, especialmente como proveedora de artículos científicos a otros centros, tanto del CSIC como externos, aunque a causa del incremento de las revistas electrónicas este servicio ha disminuido el número de transacciones.

The library of the Centre of Biological Research (Centro de Investigaciones Biológicas-CIB) is included on the CSIC Library Network. It specialises in Biology, Biomedicine and Biochemistry. It has an excellent compilation of journals and other type of publications (1,285 titles) of which 381 are active, and monographs (7,720 volumes). These resources are updated every year by acquisitions that are decided by a Committee of investigators of the 6 Departments included in the CIB, after an evaluation of the new publications. In the last 2 years our resources have increased by 259 volumes and 19 journals, either by subscription, donation or exchange. The majority of these publications are purchased by public tender organised by CSIC through different distributors. It is worth noting that last year a considerable increase in electronic subscriptions has taken place, which are available for

the investigators of CIB and CSIC through the library Web page, that counts with a regularly revised list of journals, e-books and databases. Moreover, the number of links from that Web to different Universities, health and technological centres, national and international, has also increased, as have publications free of charge. All these have improved the documentation service and the computerized library search.

The interlibrary loan has been made easier by the complete informatization of the library management. The CIB library is still one with the highest rating on the CSIC statistics, especially for enquiries relating to scientific articles from centres belonging to the CSIC and external ones, although due to the increase in electronic journals this service has reduced the number of transactions.

ORGANIGRAMA CIB



Jubilaciones, Altas y Bajas de Personal

ALTAS

M ^a CARMEN ALBO CASTELLANOS	(AYUDANTE DE INVESTIGACIÓN)
SARA M ^a BLANCO GÓMEZ	(ADMINISTRATIVO)
FRANCISCO JAVIER CAÑADA VICINAY	(CIENTÍFICO TITULAR)
ANGEL L. CORBÍ LÓPEZ	(INVESTIGADOR CIENTÍFICO)
JOSÉ FERNANDO DÍAZ PEREIRA	(CIENTÍFICO TITULAR)
ALICIA GARCÍA ARROYO	(CIENTÍFICO TITULAR)
JESÚS JIMÉNEZ BARBERO	(PROFESOR DE INVESTIGACIÓN)
M ^a ESTHER MIGUEL GÓMEZ	(AYUDANTE DE INVESTIGACIÓN)
M ^a DOLORES MUÑOZ SAUQUILLO	(ADMINISTRATIVO)
M ^a DE LOS MILAGROS RODRÍGUEZ BUENO	(ORDENANZA)
M ^a JOSÉ SAIZ SORIANO	(AYUDANTE DE INVESTIGACIÓN)
M ^a TERESA SEISDEDOS DOMÍNGUEZ	(AYUDANTE DE INVESTIGACIÓN)
GLORIA DEL SOLAR DONGIL	(CIENTÍFICO TITULAR)
ISABEL TORRES VIDAL	(AUX. INVEST. Y LAB.)
MIGUEL ANGEL VEGA PALACIO	(CIENTÍFICO TITULAR)

EXCENDENCIAS

CONSOLACIÓN GORDILLO SALAMANCA	(17/12/2001)
ROSA MARTÍNEZ DALMAU	(15/10/2002)

JUBILACIONES

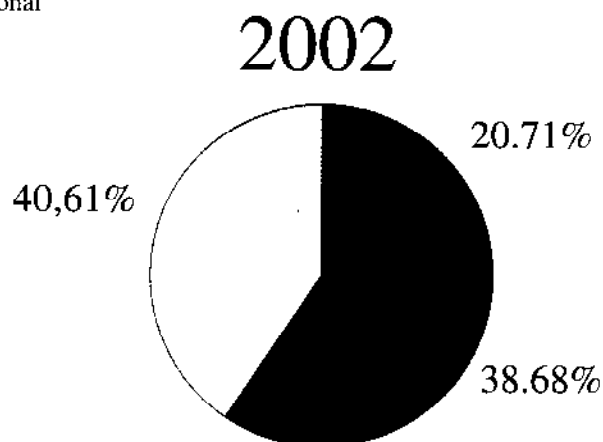
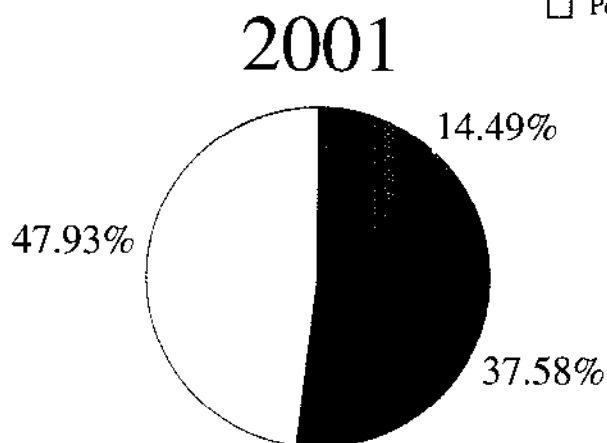
M ^a ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ GÓMEZ	(03/08/2002)
M ^a ANGELES GUIJARRO RODRÍGUEZ	(10/05/2001)
M ^a DEL CARMEN GUTIERREZ RUEDA	(23/06/2001)
MARÍA LÓPEZ RAMÍREZ	(26/06/2001)
ALEJANDRA MARTÍN RUIZ	(09/12/2001)
ANGEL PACHECO DEL OLMO	(21/09/2002)
M ^a TERESA RAPOSO TRIANO	(15/12/2001)
M ^a SOLEDAD REIG FERNÁNDEZ	(15/01/2001)
FRANCISCA VALLE RUBIO	(05/12/2001)

RESUMEN DE LOS DATOS ECONÓMICOS

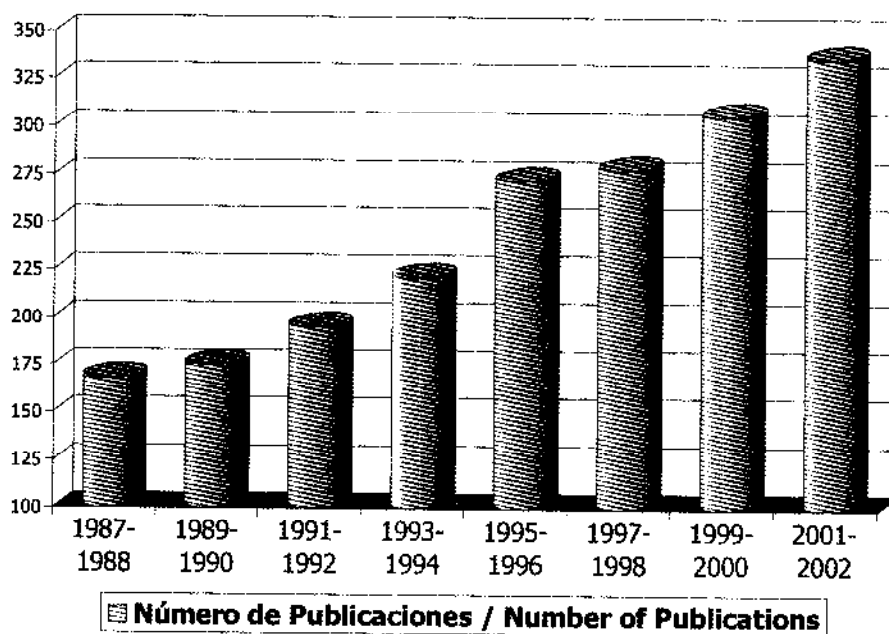
PRESUPUESTO DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Concepto	2001	2002
Presupuesto ordinario	745.866,21	1.253.046,05
Inversiones	724.848,91	1.726.837,88
Apoyo a la infraestructura	584.557,28	915.440,99
Varios	154.251,52	174.245,16
TOTAL DE INFRAESTRUCTURA DEL CENTRO	2.209.523,92	4.069.570,08
Proyectos P. Nacional, P.G.C., F.I.S. y C.A.M.	3.857.070,64	5.304.777,28
Investigación Contratada	605.209,00	623.487,29
Proyectos de la Unión Europea	1.002.470,79	1.293.516,46
Asistencia Técnica	265.667,90	385.141,07
TOTAL PROYECTOS, CONTRATOS Y ASISTENCIA TÉCNICA	5.730.418,33	7.606.922,10
PERSONAL	7.308.858,89	7.985.780,82
TOTAL	15.248.801,14	19.662.273,00

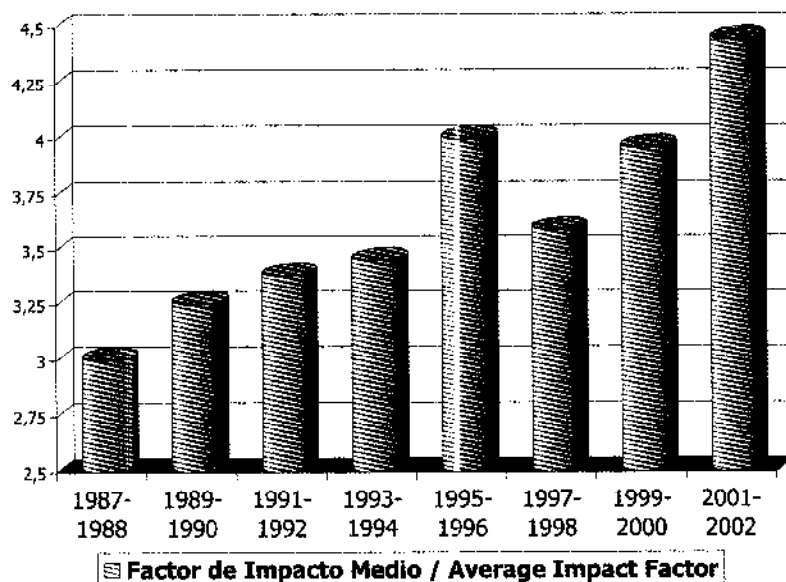
- Infraestructura
- Proyectos y contratos
- Personal



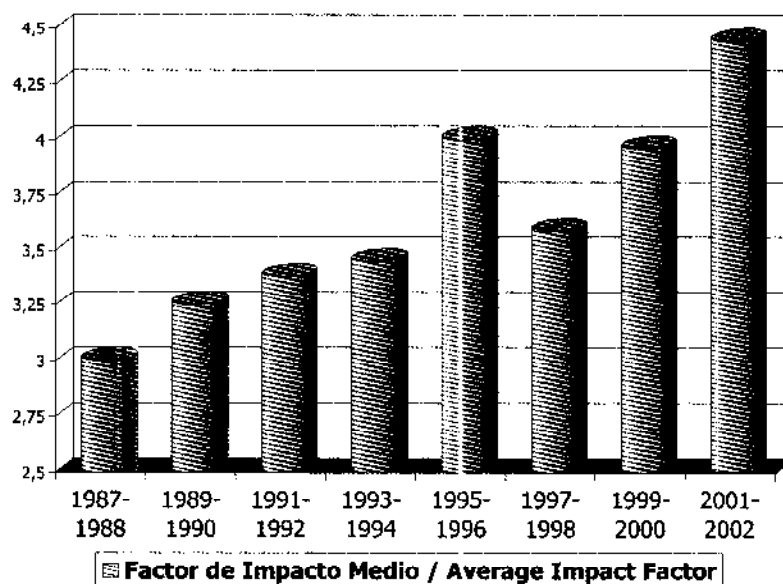
EVOLUCIÓN DEL NÚMERO DE PUBLICACIONES Y SU IMPACTO



Evolución del Factor de Impacto medio de las revistas utilizadas



Evolución del Factor de Impacto medio de las revistas utilizadas



Índice de Investigadores en Plantilla

NOMBRE	CATEGORÍA	E-MAIL	TEL. -EXT.	PÁGINA
- Abrisqueta Zarrabe, J. Antonio	Investigador C.	abrisqueta@cib.csic.e	91 5620307	88
- Aller Tresguerres, Patricio	Investigador C.	aller@cib.csic.es	4247	13
- Andreu Morales, J. Manuel	Profesor I.	j.m.andreu@cib.csic.es	4381	126
- Aparicio Alonso, Pedro J.	Profesor I.	pjaparicio@cib.csic.es	4363	
- Barasoain Blasco, Isabel	Científico T.	i.barasoain@cib.csic.es	4216	182
- Bernabeu Quirante, Carmelo	Profesor I.	Bernabeu.c@cib.csic.es	4246	163
- Botella Cubells, Mª Luisa	Científico T.	cibluisa@cib.csic.es	4312	163
- Cañada Vicinay, Javier	Científico T.	jcanada@cib.csic.es	4374	109
- Casado Moragón, Angela	Científico T.	acasado@cib.csic.es	4219	90
- Castañera Domínguez, Pedro	Profesor I.	castan@cib.csic.es	4264	80
- Corbí López, Angel	Investigador C.	acorbi@cib.csic.es	4248	168
- De Pablo Dávila, Flora	Profesor I.	fdepablo@cib.csic.es	4360	42
- Del Mazo Martínez, Jesús	Científico T.	jdelmazo@cib.csic.es	4324	34
- De La Hera Martínez, Antonio	Investigador C.	adelaheira@cib.csic.es	4394	
- De La Rosa Cano, Enrique	Investigador C.	ejdelarosa@cib.csic.es	4274	42
- De La Torre García-Quintana,	Profesor I.	delatorrec@cib.csic.es	4307	9
- Díaz Fernández, Eduardo	Científico T.	ediaz@cib.csic.es	4426	221
- Díaz Orejas, Ramón	Investigador C.	ramondiaz@cib.csic.es	4351	239
- Díaz Ruiz, J. Ramón	Profesor I.	jrdiazruiz@cib.csic.es	4406	73
- Díez Cortés, José Luís	Investigador C.?	jldiez@cib.csic.es	4311	27
- Espinosa Padrón, Manuel	Profesor I.	mespinosa@cib.csic.es	4209	135
- Esponda Fernández, Pedro	Investigador C.	esponda@cib.csic.es	4336	38
- Fernández Tresguerres, Mª Elena	Científico T.	etresguerres@cib.csic.es	4353	239
- García Arroyo, Alicia	Científico T.	agarciaa@hlpr.insalud.es		159
- García González, Pedro	Investigador C.	pgarcia@cib.csic.es	4428	216
- García Hermida, Ofelia	Científico T.	ofeliagh@cib.csic.es	4355	93
- García López, Ernesto	Profesor I.	e.garcia@cib.csic.es	4424/21	216
- García López, J.Luis	Profesor I.	jlgarcia@cib.csic.es	4418	221
- García Luque, Isabel	Científico T.	igarcia@cib.csic.es	4410	70
- García Mendoza, Concepción	Investigadora C.	cgm@cib.csic.es	4262	204
- García Pardo, Angeles	Investigadora C.	agarciapardo@cib.csic.es	4430	152
- Giménez Gallego, Guillermo	Profesor I.	gimenez_gallego@cib.csic.es	4378	109

Índice de Investigadores Actuales en Plantilla

NOMBRE	CATEGORÍA	E-MAIL	TLF. -EXT.	PÁGINA
- Giraldo Suárez, Rafael	Científico T.	rgiraldo@cib.csic.es	4269	239
- Goday Baylina, Clara	Científico T.	godaylab@cib.csic.es	4314	25
- González Becerra, Aldo	Científico T.	aldo@cib.csic.es	4414	243
- González Manchón, Consuelo	Científico T.	cgmanchon@cib.csic.es	4441	93
- Granadino Goenechea, Begoña	Científico T.	begogran@cib.csic.es	4213	20
- Hernández Valenzuela, Pablo	Científico T.	p.hernandez@cib.csic.es	4232	2
- Jiménez Barbero, Jesús	Profesor I.	jjbarbero@cib.csic.es	4370	109
- Krimer Smunis, Dora B.	Científico T.	dbkrimer@cib.csic.es	4238	2
- Lamas Peláez, Santiago	Investigadora C.	slamas@cib.csic.es	4302	100
- Larraga Rodríguez de Vera, Vicente	Profesor I.	vlarraga@cib.csic.es	4207	130
- Leal Ojeda, J. Antonio	Investigador C.	aleal@cib.csic.es	4437	213
- López-Moya Gómez, Juan José	Científico T.	jjlopez@cib.csic.es	4404	73
- López Abella, Dionisio	Profesor I.	dlabela@cib.csic.es	4404	73
- López García, Paloma	Investigadora C.	pig@cib.csic.es	4203	117
- López García, Rubens	Profesor I.	ruben@cib.csic.es	4418/17	216
- Lozano Puerto, M ^a Rosa	Científico T.	rlozano@cib.csic.es	4368	109
- Llorca Blanco, Oscar	Científico T.	olorca@cib.csic.es	4446	143
- Martín González Antonio	Investigador C.		4436	86
- Martín Requero, M ^a Angeles	Científico T.	amrequero@cib.csic.es	4224	93
- Martínez Ferrer, Angel T.	Profesor I.	atmartinez@cib.csic.es	4407	194
- Martínez Hernández, M ^a Jesús	Científico T.	mjmartinez@cib.csic.es	4439	194
- Medina Díaz, F. Javier	Investigador C.	fjmedina@cib.csic.es	4261	56
- Moreno Díaz de La Espina, Susana	Investigador C.	smoreno@cib.csic.es	4257	48
- Ortego Alonso, Félix	Investigador C.	ortego@cib.csic.es	4266	80
- Páez Abril, Eduardo	Científico T.	epaez@cib.csic.es	4387	190
- Parrilla Sanchez, Roberto	Profesor I.	rparrilla@cib.csic.es	4204	93
- Peñalva Soto, Miguel A.	Profesor I.	penalva@cib.csic.es	4358	233
- Pérez Prieto, Sara Isabel	Tit. Sup. Esp.	saraip@cib.csic.es	4385	208
- Pérez Sala, M ^a Dolores	Científico T.	dperezsala@cib.csic.es	4402	100
- Ramírez de Verger, Juan M	Profesor I.	jmramirez@cib.csic.es	4369	109
- Rey Campos, Fco. Javier	Científico T.	Javier.rey@cib.csic.es	4416	20
- Rial Zueco, Eduardo	Científico T.	rial@cib.csic.es	4236	105
- Risueño Almeida, M ^a Carmen	Investigador C.	risueno@cib.csic.es	4230	62
- Rivas Caballero, Germán	Científico T.	grivas@cib.csic.es	4304	139

NOMBRE	CATEGORÍA	E-MAIL	TLF. -EXT.	PÁGINA
- Rivas López, Luis	Científico T.	Luis_rivas@cib.csic.es	4234	121
- Rodríguez de Córdoba, Santiago	Profesor I.	srdecordoba@cib.csic.es	4432	185
- Rodríguez Martínez, Ramón B.	Científico T.	rbrod@cib.csic.es	4421	93
- Rodríguez Saint-Jean, Sylvia	Tit. Sup. Esp.	sylvia@cib.csic.es	4384	208
- Rojo Hernández, José M ^a	Investigador C.	jmrojo@cib.csic.es	4217	146
- Romero Garrido, Antonio	Investigador C.	romero@cib.csic.es	4244	109
- Sánchez Rodríguez, Lucas	Investigador C.	lsanchez@cib.csic.es	4322	30
- Sánchez Testillano, Pilar	Científico T.	testillano@cib.csic.es	4365	62
- Schwartzman Blinder, J. Bernardo	Investigador C.	schwartzman@cib.csic.es	4233	2
- Serra Yoldi, M ^a Teresa	Científico T.	mserra@cib.csic.es	4411	70
- Suárez González, M ^a Teresa	Científico T.	teresa@cib.csic.es	4410	233
- Silva González, Augusto	Investigador C.	asilva@cib.csic.es	4431	176
- Teixidó Calvo, Joaquín	Investigador C.	joaquint@cib.csic.es	4392	156
- Tenllado Peralo, Joaquín	Científico T.	tenllado@cib.csic.es	4405	73
- Vega Palacios, Miguel Angel	Científico T.	mavega@cib.csic.es	4333	172
- Vidal Caballero, Miguel A	Científico T.	mvidal@cib.csic.es	4382	16

(NOTA: El listado telefónico incluye los cuatro dígitos de la extensión cuando se marca la centralita del CIB, 91 837 3112 salvo líneas directas indicadas por siete dígitos)