

CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLOGICAS
1991 - 1992

Memoria Científica 1991-1992

**CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLOGICAS**

CSIC

**Velázquez, 144 - 28006 Madrid, España
Teléfono: (341) 564-4562 ó 561-1800
Fax: (341) 562-7518**

Cubierta
Cover

Colonias de *Pseudomonas putida* creciendo sobre una placa de agar con X-gal. El gen *lacZ* con el transposón mini-Tn5-*lac tet1*, ha sido insertado a continuación de un promotor inducido en fase estacionaria (*starvation-induced promoter*). Esto se refleja en la morfología "ojo de pez" de las colonias indicando que la subpoblación de células del centro está en una fase de crecimiento más avanzada. (Ver : V. De Lorenzo *et al.* en pg. 92)

Colonies of Pseudomonas putida grown in X-gal agar. The lac-Z gene with the mini-Tn5-lac tet/1, transposon has been inserted behind a stationary phase inducible promoter (starvation-induced promoter). This leads to "fish eye" colonies indicating that the subpopulation of cells in the center is in a more advanced growth phase. (See: V. De Lorenzo et al. in page 92)

Coordinación Editorial

y Diseño: Flora de Pablo
Miguel Vicente
Jose Luis Cánovas

Procesamiento de Textos: M^a Victoria Lafita
Angeles Sacristán

Fotografía: Ricardo Uña
Rosa Díaz

Fotocomposición: PUBLI PRINT

Imprime: SPEC GRAF

TABLA DE CONTENIDOS

	(Pág)
- Recuerdos del CIB (Profesora Margarita Salas).....	5
- Comentarios de la Dirección.....	9
- Resumen de la actividad investigadora de los grupos	
Transducción de Señales y Biología Leucocitaria	11
Diferenciación de Linfocitos Humanos	15
Diferenciación Macrofágica y Receptores de Membrana	18
Genética del Sistema del Complemento	21
Genética Humana	24
Epítomos Funcionales de Proteínas de Superficie Celular y Citoesqueleto	26
Regulación de la Expresión de Genes del Sistema Inmune	28
Adhesión Celular en el Sistema Inmune	31
Reconocimiento y Activación de Linfocitos T	34
Metabolismo y Patología Molecular	36
Hormonas y Neuropeptidos	39
Proliferación y Diferenciación de Células Mieloides	41
Regulación de la Expresión Genética en Mamíferos	44
Biología de la Reproducción	46
Análisis Molecular de la Meiosis	48
Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados	50
Biología Molecular de los Cromosomas Eucarióticos	53
Biología del Desarrollo de <i>Drosophila</i>	55
Genética del Desarrollo en Dípteros	58
Biología Celular y del Desarrollo de Nematodos	61
Reproducción Celular	64
Química de Proteínas	67
Estructura e Interacciones de las Proteínas de los Microtúbulos	70
Fotobioquímica Vegetal	74
Fotosíntesis Bacteriana	76
Mutagénesis Dirigida de la Proteína Desacoplante Expresada en Levaduras	78
Proteínas de <i>Leishmania</i>	80

Replicación y Mantenimiento de Plásmidos Bacterianos	83
Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-Positivas	86
Biología Molecular de Bacterias Gram-Positivas	89
Genética Molecular de <i>Pseudomonas</i>	92
Control Genético del Ciclo Celular	96
Genética Bacteriana	99
Microbiología Aplicada	104
Genética Molecular de <i>Aspergillus</i>	107
Mecanismos de Resistencia Inducida en Plantas	110
Entomología, Relación Planta - Insecto	112
Biología Molecular de Plantas	116
Biología Molecular de la Resistencia Vegetal.	118
Virología Vegetal	121
Biología Celular y Molecular Vegetal	123
Bioquímica de Hongos	128
Carbohidratos Microbianos	130
Fisiología y Bioquímica de Hongos Filamentosos	132
Biodegradación de la Lignina	134
Genética Molecular de Plantas	142
Organización Nuclear Durante el Desarrollo de Plantas	146
Fijación Directa del Nitrógeno	150
Marcadores Tumorales y Procesos de Envejecimiento	152
Bacterias y Protozoos del Hidrohabitat del Parque de Doñana	156
Virología Molecular	157
Patologías Microbianas de Teleósteos	161
Vectores CEDIG	163
- Tesis Doctorales.....	165
- Tesinas de Licenciatura.....	167
- Premios y Distinciones.....	168
- Organización de Congresos y Cursos.....	170
- Seminarios del Centro.....	174
- Personal de los Servicios del Centro	179
- Resumen de datos económicos.....	186
- Evolución del número de publicaciones y su impacto.....	189
- Índice alfabético de investigadores y lista de teléfonos.....	192

RECUERDOS DEL CIB

Margarita Salas.

**Centro de Biología Molecular
"Severo Ochoa".**



Después de finalizar la Licenciatura en Ciencias Químicas en la Universidad Complutense, inicié, en 1961, la Tesis Doctoral con Alberto Sols en el Departamento de Enzimología del Instituto Gregorio Marañón. El Instituto estaba dirigido por José Luis Rodríguez-Candela, quien había sido el organizador del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), inaugurado en 1956.

Cuando yo me incorporé al Departamento de Enzimología, la primera generación de becarios de Alberto Sols estaba realizando su fase postdoctoral en Estados Unidos. Poco a poco, fueron regresando al CIB, trayéndonos novedades científicas. Aún recuerdo una serie de seminarios impartidos por Carlos Asensio, en los que nos contaba, entre otras novedades, el modelo revolucionario del "operón" de Jacob y Monod. Fueron tres años intensos de doctorado en los que me inicié en la Bioquímica. Quiero aprovechar estas líneas para expresar mi recuerdo agradecido a Alberto Sols, por sus enseñanzas en esta fase tan decisiva para la vida de un investigador.

Después de un período postdoctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Nueva York con Severo Ochoa, donde pasé de la Bioquímica a la Biología Molecular, tomé la decisión de volver a España y tratar de iniciar, junto con Eladio Viñuela, una línea de investigación en Biología Molecular, utilizando el Bacteriófago $\phi 29$ como sistema modelo.

La vuelta a España en 1967 fue posible gracias a la ayuda y apoyo de dos personas que confiaron en nosotros, José Luis Rodríguez-Candela y Severo Ochoa, a quienes quiero expresar mi más profunda gratitud. José Luis Rodríguez-Candela hizo posible

nuestra vuelta al CIB pues, generosamente, nos cedió inicialmente un laboratorio de cuatro ventanas, el 405, y después, a medida que nuestro grupo fue aumentando de tamaño, nos fue cediendo nuevos laboratorios hasta ocupar el ala de Velázquez desde el laboratorio 402 hasta el ascensor. Severo Ochoa nos ayudó a conseguir una ayuda del Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research, gracias a la cual pudimos comprar nuestro primer equipo y reactivos, cosa realmente complicada en aquella época. Recuerdo que uno de los primeros aprendizajes a la vuelta a España era el de cómo importar equipo y comprar reactivos en el extranjero.

A nuestra vuelta a España, también se dió la circunstancia favorable que, en 1968, se convocaron las primeras becas del Plan de Formación de Personal Investigador con lo cual se pudieron incorporar a nuestro laboratorio en el CIB nuestros primeros becarios, Enrique Méndez, Jesús Avila y Antonio Talavera, quienes aparecen en la fotografía (mostrada en la cabecera) del Departamento de Metabolismo del Instituto Gregorio Marañón, tomada en Julio de 1968. Quiero expresar aquí el recuerdo agradecido de José Avelino Pérez-Geijo, gran amigo, fuente inagotable de becarios, quien fue primero Secretario y, desde 1969, Vicedirector y virtual Director del CIB hasta su fallecimiento en 1975.

En 1969 se creó, gracias de nuevo al apoyo de Jose Luis Rodríguez Candela, la Sección de Biología Molecular dentro del Instituto Gregorio Marañón, que pasó a convertirse, en 1971, en Departamento de Biología Molecular, dirigido por Eladio Viñuela, donde yo dirigía la Sección de Genética Molecular. De hecho, éste fue el primer Departamento de Biología Molecular creado en España. En 1975, el Departamento de Biología Molecular se convirtió en Instituto de Virología y Genética Molecular.

En 1970 tuvo lugar la creación del Taller de Instrumentación del CIB, que supuso un importante apoyo para el trabajo de investigación del Centro. Su primer Jefe fue Javier Corral, un físico a quién Eladio Viñuela descubrió y a quién ofreció incorporarse al CIB, con los escasos recursos que se tenían en aquella época. Gracias a los conocimientos y a la eficiencia de Javier Corral, el Taller de Instrumentación fue creciendo en pocos años, y en 1973, ya contaba con 8 ayudantes y 9 personas en colaboración, que formaban parte de los Servicios de Fotografía, Delineación, Taller Mecánico, Eléctrico y Electrónico, y Plásticos (en la memoria del CIB de 1973 se describe que en ese año se fabricaron 30 cubas de electroforesis en dicho Servicio). El Taller de Instrumentación del CIB fue el modelo que Eladio Viñuela y Javier Corral incorporaron al Departamento Técnico del Centro de Biología Molecular (CBM), y que constituye uno de sus pilares más importantes.

En Septiembre de 1977, después de diez años de trabajo en el CIB, me trasladé al recién inaugurado CBM. De esos diez años en el CIB guardo un recuerdo imborrable. Fueron años difíciles, con pocos medios materiales, pero con mucho entusiasmo y dedicación a la investigación. Como ejemplo del espíritu de trabajo que había en esos años, Angel Pellicer recordaba, en la Reunión del 25 Aniversario del Bacteriófago ϕ 29 celebrada recientemente en Madrid, la anécdota de que el lema del Departamento de Biología Molecular era que los becarios trabajasen hasta medianoche y después se fuesen a la Biblioteca a dormir sobre el PNAS.

Creo que no me equivoco al decir que el CIB ha sido la casa madre de la Biología moderna en España, desde donde irradió a numerosos Centros de la Universidad y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Deseo sinceramente que el CIB siga siendo fuente continuada de investigadores en el área de Biología en España.

MEMORIES OF THE CIB

Margarita Salas

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa".

After finishing my Master in Chemistry at the Complutense University, I started, in 1961, the work of my Ph.D. Thesis with Alberto Sols in the Department of Enzymology at the Institute Gregorio Marañón. The Institute was directed by José Luis Rodríguez-Candela, who had been the organizer of the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), inaugurated in 1956.

When I started in the Department of Enzymology, the first generation of Ph.D. students of Alberto Sols were doing their postdoctoral stay in the United States. Little by little, they came back to the CIB, bringing scientific news. I still remember a series of seminars presented by Carlos Asensio in which he told us, among other news, the revolutionary model of the "operon" from Jacob and Monod. I spent three intense years of Ph.D. work during which I was initiated in Biochemistry. I would like to take this opportunity to express my grateful remembrance of Alberto Sols, for his teaching in this period so decisive for the life of a scientist.

After a postdoctoral period in the Department of Biochemistry at New York University with Severo Ochoa, where I switched from Biochemistry to Molecular Biology, I took the decision to come back to Spain and try to initiate, together with Eladio Viñuela, a research group in Molecular Biology, using Bacteriophage ϕ 29 as a model system.

Coming back to Spain in 1967 was possible thanks to the help and support of two persons who trusted us, José Luis Rodríguez-Candela and Severo Ochoa, to whom I would like to express my deepest gratitude. José Luis Rodríguez-Candela made possible our return to the CIB since, very generously, gave us initially a laboratory of four windows, number 405, and then, when our group increased in size, he gave us new laboratories, occupying all the Velázquez wing, from laboratory number 402 till the elevator. Severo Ochoa helped us to get a grant from the Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research, thanks to which we could buy our first equipment and reagents, something really complicated at that time. I remember that one of the first things one had to learn when one returned to Spain was how to import equipment and to buy reagents abroad.

When we came back to Spain we were lucky because, in 1968, the first fellowships of Plan de Formación de Personal Investigador were available, and our first Ph.D. students could be incorporated to our laboratory in the CIB. They were Enrique Méndez, Jesús Avila and Antonio Talavera who are present in the photography (shown above) of the members of the Department of Metabolism of the Institute Gregorio Marañón, taken in 1968. I would like to express here my memory and gratitude to José Avelino Pérez-Geijo, a great friend and source of Ph.D. students, who was, first Secretary, and , since 1969, Vicedirector and virtual Director of the CIB until his death in 1975.

In 1969, thanks again to the support of José Luis Rodríguez-Candela, the Section of Molecular Biology was created within the Institute Gregorio Marañón. In 1971, the Section was converted into the Department of Molecular Biology, directed by Eladio Viñuela, including the Section of Molecular Genetics, directed by myself. In fact, this one was the first Department of Molecular Biology created in Spain. In 1975, the Department of Molecular Biology was converted into Institute of Virology and Molecular Genetics.

In 1970, the Instrumentation Workshop of the CIB was created, and that was an important help for the research work at the Center. The first Chief was Javier Corral, a physicist discovered by Eladio Viñuela, to whom he offered to come to the CIB, with the very scarce resources available at that time. Thanks to the knowledge and efficiency of Javier Corral, the Instrumentation Workshop grew up in a few years and, in 1973, it already had 8 Technicians and 9 persons in collaboration, that formed part of the Services of Photography, Delineation, Mechanic, Electric and Electronic Workshops, and Plastics (in the CIB Report of 1973 the Plastics Service is reported to have made 30 electrophoresis cuvettes). The Instrumentation Workshop at the CIB was the model that Eladio Viñuela and Javier Corral incorporated to the Technical Department of the Center of Molecular Biology (CBM), that constitutes one of its more important assets.

In September 1977, after 10 years of work at the CIB, I moved into the CBM, just inaugurated. Of those 10 years at the CIB I keep an unforgettable memory. They were difficult years, with few resources, but with a lot of enthusiasm and dedication to research. As an example of the motivation for work on those years, Angel Pellicer remembered, in the Meeting of the 25th Anniversary of "Bacteriophage ø29" celebrated recently in Madrid, that the lemma of the Department of Molecular Biology was that the Ph.D. students should work until midnight and then they should go to the Library to sleep on the PNAS.

I think I am not wrong if I say that the CIB has been the mother house of modern Biology in Spain, from where it spread out to numerous Centers of both the University and the Spanish Research Council. I sincerely hope that the CIB will continue to be a source of researchers in the Biology area in Spain.

COMENTARIOS DE LA DIRECCION COMMENTS OF THE DIRECTOR

El Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) se encuentra entre los centros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) con más larga tradición en la investigación en Biología básica. Los dos primeros años de la década de los noventa han visto consolidarse las nuevas tendencias del enfoque molecular de la Biología, que se iniciaron en la década anterior gracias a tecnologías muy potentes de análisis, tales como la ingeniería genética, los cultivos *in vitro* y los anticuerpos monoclonales.

Muchos problemas de la Biología se pueden hoy día plantear en términos moleculares, incluso las funciones celulares esenciales son ya susceptibles de un enfoque molecular, reservado, hasta hace muy poco tiempo, a sistemas sencillos. La memoria científica, que aquí presentamos, refleja la progresiva incorporación de muchas líneas del CIB a este enfoque contemporáneo de la Biología, resultado tanto del esfuerzo de grupos ya existentes en el CIB, como de la incorporación de nuevos investigadores a la plantilla del Centro.

En la actualidad el personal científico del CIB lo forman 12 Profesores de Investigación, 36 Investigadores Científicos y 38 Colaboradores Científicos que hasta julio de 1992 se agrupaban en once Unidades Estructurales (NOTA 1). En el bienio 1991-1992 se jubilaron los Profesores Gonzalo Giménez y Fernando Silló y los Investigadores Rosario Gil y Carmen Cándida González; se incorporaron al Centro 2 Investigadores y 4 Colaboradores.

Como componentes de un centro público de in-

The Centro de Investigaciones Biológicas (Biological Research Centre, or CIB) is among the centres of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Superior Scientific Research Council, or CSIC) with longer tradition in research in basic Biology. During the first two years of the nineties the new trends, brought about by the molecular approach to Biology, have consolidated. This has been the consequence of work initiated in the previous decade, that took advantage of new powerful techniques, as those of genetic engineering, in vitro culture, and monoclonal antibodies.

Many biological questions can be formulated nowadays in molecular terms. Even essential cellular functions can benefit from this kind of approach that was, up to recent times, reserved only for simple systems. The present scientific report of our activities shows the gradual move of many of the CIB research lines towards this contemporary trend in Biology. This progress is the result both of the efforts of previously existing groups, as well as from new scientists incorporated to the CIB staff.

Presently the CIB scientific staff is formed by 12 Professors, 36 Investigators and 38 Scientific Collaborators. They were organised, up to July 1992, in eleven Units (NOTE 1). During these two years Profs. Gonzalo Giménez and Fernando Silló, and the Investigators Rosario Gil and Carmen Cándida González retired, while 2 Investigators and 4 Collaborators joined the Centre.

Nota 1

Unidades Estructurales de Investigación:

Genética Bacteriana
Citogenética

Ingeniería Genética
Estructuras Celulares

Biomembranas
Fitopatología
Fisiología Endocrina
Virología

Reproducción Celular
Microbiología Aplicada
Inmunofarmacología

vestigación tenemos el deber de realizar un trabajo de calidad, y de mejorarlo cada día. En este bienio el CIB no sólo ha mejorado su actividad científica en publicaciones (como muestran las gráficas incluídas en la sección final), congresos y seminarios, sino que además ha sido objeto de una evaluación científica realizada por una comisión *ad hoc* formada por científicos de prestigio internacional reconocido (NOTA 2). Las recomendaciones de esta comisión han preparado al Centro para introducir los reajustes necesarios dirigidos a optimizar y actualizar sus líneas de trabajo y sus recursos.

Sin lugar a dudas, las modificaciones que deben introducirse en el CIB requieren la aceptación del asesoramiento externo que se ha realizado, una labor que comprometerá a los científicos del Centro así como a la directiva del CSIC. El impulso inicial dado por la dirección del Centro, ha sido respaldado tanto por la directiva del CSIC como por un importante grupo de investigadores del Centro, lo que nos permite ser optimistas para el futuro. Las áreas temáticas principales de los grupos actuales del CIB son: Inmunología, Biología Celular y del Desarrollo, Estructura y Función de Proteínas, Microbiología Molecular y Biología de Plantas.

El CIB se plantea así, hoy día, su renovación científica para adecuar el trabajo, sus instalaciones y sus servicios a las líneas más actuales y punteras. Dentro de esta renovación se encuentra la presente edición de la memoria que, en su forma y contenido, intenta realzar el protagonismo del grupo de investigación y de su producción científica a lo largo del bienio 1991-92. □

As part of a public research centre it is our duty to produce research of high quality, and to improve constantly. During these two years the scientific activities of the CIB, including the number and quality of publications, and the participation in meetings and seminars, have improved (as shown in the graphs included in the final section). In addition, the CIB has been scientifically evaluated by an external ad hoc committee formed by scientists with international prestige (NOTE 2). Their recommendations have prepared the Centre for implementing the changes needed to optimise and update its research lines and resources.

Introduction of the appropriate modifications certainly requires the acceptance of this external advice, a task in which both the scientists of the Centre and the CSIC authorities have to be involved. We see the future with optimism, since the leading initiative undertaken by the CIB Director has been supported by the CSIC authorities and by an important group of the Centre's scientists. The main areas of research of the CIB groups presently are: Immunology, Cell and Developmental Biology, Protein Structure and Function, Molecular Microbiology, and Plant Biology.

In consequence, the CIB is presently undergoing a scientific renewal to bring its work, equipment and facilities into line with the forefront of contemporary research. This report of our research activities, reflecting this policy of renewal, emphasises the prevailing role of the research group and its scientific productivity during 1991-1992. □

Nota 2

Comisión de Evaluación:

Michael Akam (Wellcome/CRC Institute, Cambridge, Inglaterra)
José Pío Beltrán (Inst. de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia)
Jean-Charles Cerotinni (Ludwig Institute, Lausanne, Suiza)
Juan E. Feliú (Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid)

John W. Snape (John Innes Centre for Plant Science Research, Inglaterra)
Aaron Shatkin (Waksman Institute of Microbiology, New Jersey, USA)
Kai Simons (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania)

Transducción de Señales y Biología Leucocitaria

Leukocyte Biology and Signal Transduction

Faustino Mollinedo	(Jefe de Grupo) (Group leader)	Personal Científico <i>Tenured Scientist</i>
Dolores Pérez-Sala		Investigador Contratado <i>Tenure-track Scientist</i>
Dolores Collado-Escobar		Postdoctorales <i>Postdoctoral Fellows</i>
Rafael Pulido		
Jesús Balsinde		
Alicia Eguinoa		Predoctorales <i>Graduate Students</i>
Ignacio Flores		
Consuelo Gajate		
Sonia Zamarreño		
Eduardo R. S. Roldán (1991)		Investigador Asociado <i>Associate Scientist</i>
Rosa Martínez-Dalmau		Personal Técnico <i>Technical Staff</i>



El tema central del laboratorio es el análisis molecular de procesos implicados en la activación y desarrollo de granulocitos humanos. Las líneas de trabajo que se desarrollan en el laboratorio incluyen:

Análisis de los mecanismos que regulan la translocación a la superficie celular de un gránulo secretor rico en gelatinasa en neutrófilos humanos (proteínas de la superfamilia Ras, genes de la familia *src*, proteínas fijadoras de Ca^{2+}). La movilización de dicho gránulo parece jugar un papel crucial en la regulación de la funcionalidad de los neutrófilos humanos y en el proceso de diapedesis.

The main research area in this laboratory is the molecular analysis of cell surface and transcriptional events involved in the activation and development of human granulocytes. Our current research interests include:

Analysis of the mechanisms regulating the translocation to the cell surface of a gelatinase-rich secretory granule in human neutrophils (Ras superfamily proteins, src gene family, Ca^{2+} -binding proteins). The mobilization of this granule seems to play a crucial role in the regulation of neutrophil functionality and diapedesis.

Caracterización de una fosfolipasa D (regulación, purificación y clonaje) que juega un papel preponderante en procesos de transducción de señal en leucocitos. Asimismo, estamos investigando el papel que juega el ácido fosfatídico, producto de la acción de la fosfolipasa D, en procesos de transducción de señal.

Caracterización de nuevos antígenos leucocitarios (funcionalidad y clonaje) implicados en la funcionalidad granulocítica. En colaboración con la Dra. I. Barasoain (C.I.B.), hemos preparado una batería de anticuerpos monoclonales frente a neutrófilos humanos y hemos seleccionado varios de ellos que reconocen nuevos antígenos leucocitarios.

Papel del factor transcripcional AP-1 (proto-oncogenes *fos* y *jun*) y de proteínas con actividad tirosina-quinasa (genes de la familia *src*) en la diferenciación mieloide (diferenciación granulocítica versus diferenciación monocítica). Asimismo, estamos iniciando estudios de caracterización de nuevos genes implicados en las fases tempranas de la diferenciación granulocítica mediante genotecas de substracción.

Para inducir la activación o diferenciación de las células humanas empleamos distintos agentes, incluyendo ciertas citoquinas (TNF α , GM-CSF y G-CSF). De este modo, se analizan mecanismos de transducción de señal implicados en la acción de dichas citoquinas sobre leucocitos humanos. □

Characterization of a phospholipase D which plays a key role in leukocyte signaling processes. This research includes the study of the regulatory properties of the enzyme as well as its purification and cloning. Furthermore, we are investigating the role of phosphatidic acid, the product of phospholipase D action, on signal transduction processes.

Functional characterization and cloning of novel leukocyte antigens involved in granulocyte functions. In collaboration with Dr. I. Barasoain (C.I.B.), we have prepared a battery of monoclonal antibodies against human neutrophils and we have succeeded in selecting several monoclonal antibodies that recognize apparent novel leukocyte antigens.

Role of AP-1 transcription factor (fos and jun proto-oncogenes) and tyrosine kinases (src gene family) in myeloid differentiation (granulocytic vs. monocytic differentiation). Moreover, we are starting studies leading to the characterization of new genes involved in early phases of granulocytic differentiation through subtracted libraries.

We are using different agents, including certain cytokines (TNF α , GM-CSF and G-CSF) to activate or differentiate myeloid cells. In this context, we are also examining signaling events involved in the action of the above cytokines on human leukocytes. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- DGICYT, PM89-0003 (1990-1992)
- Comunidad de Madrid, C181/91 (1991-1993)

Publicaciones
Publications

- Roldán, E.R.S., Fragio, C., Harrison, R.A.P. and Mollinedo, F.: The phospholipase A₂ of mammalian spermatozoa: modulation by phosphoinositide-derived diacylglycerol and role of its products during acrosomal exocytosis. In: "Comparative Spermatology 20 years after". (Ed.) B. Baccetti, pp. 221-226, Raven Press, New York 1991.
- García, M.C., García, C., Gijón, M.A., Fernández-Gallardo, S., Mollinedo, F. and Sánchez-Crespo, M.: Metabolism of platelet-activating factor in human haematopoietic cell lines. Differences between myeloid and lymphoid cells. *Biochem. J.* 273, 573-578, 1991.
- Mollinedo, F., Vaquerizo, M.J. and Naranjo J.R.: Expression of *c-jun*, *jun B* and *jun D* proto-oncogenes in human peripheral blood granulocytes. *Biochem. J.* 273, 477-479, 1991.
- Mollinedo, F., Gajate, C. and Schneider, D.L.: Cytocrome b co-fractionates with gelatinase-containing granules in human neutrophils. *Mol. Cell. Biochem.* 105, 49-60, 1991.
- Mollinedo, F., Pulido, R., Lacal, P.M. and Sánchez-Madrid, F.: Mobilization of gelatinase-rich granules as a regulatory mechanism of early functional responses in human neutrophils. *Scand. J. Immunol.* 34, 33-43, 1991.
- Roldán, E.R.S. and Mollinedo, F.: Diacylglycerol stimulates the Ca²⁺- dependent phospholipase A₂ of ram spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 294-300, 1991.
- Fonteriz, R.I., Sánchez, A., Mollinedo, F., Collado-Escobar, D. and García-Sancho, J.: The role of intracellular acidification in calcium mobilization in human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1093, 1-6, 1991.
- Balsinde, J., Diez, E. and Mollinedo, F.: Arachidonic acid release from diacylglycerol in human neutrophils. Translocation of diacylglycerol-deacylating enzyme activities from an intracellular pool to plasma membrane upon cell activation. *J. Biol. Chem.* 266, 15638-15643, 1991.
- Balsinde, J. and Mollinedo, F.: Platelet-activating factor synergizes with phorbol myristate acetate in activating phospholipase D in the human promonocytic cell line U937. Evidence for different mechanisms of activation. *J. Biol. Chem.* 266, 18726-18730, 1991.
- Mollinedo, F. and Naranjo, J.R.: Uncoupled changes in the expression of the *jun* family members during myeloid cell differentiation. *Eur. J. Biochem.* 200, 483-486, 1991.

Publicaciones (continuación)

Publications (continued)

- Mollinedo, F. and Naranjo, J.R.: Expresión de los proto-oncogenes *fos* y *jun* durante la diferenciación macrofágica/monocítica de células humanas. En "Bases moleculares del cáncer, aplicaciones clínicas y desarrollo tecnológico" (Eds.) Lacal, J.C. y Barbacid, M. pp. 457-470, Farnalindustria, Madrid 1991.
- Lacal, P.M., Barasoain, I., Sánchez, A., García-Sancho, J., Flores I. and Mollinedo, F.: A monoclonal antibody that detects a specific human neutrophil antigen involved in phorbol myristate acetate- and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-triggered respiratory burst. *J. Immunol.* 148, 161-168, 1992.
- Pulido, R., Alvarez, V., Mollinedo, F. and Sánchez-Madrid, F.: Biochemical and functional characterization of the leukocyte tyrosine phosphatase CD45 (CD45RO, 180 kDa) from human neutrophils. *In vivo* upregulation of CD45RO plasma membrane expression on patients undergoing hemodialysis. *Clin. Exp. Immunol.* 87, 329-335, 1992.
- Baiboa, M.A., Balañde, J., Aramburu, J., Mollinedo, F. and López-Botet, M.: Phospholipase D activation in human natural killer cells through the Kp43 and CD16 surface antigens takes place by different mechanisms. Involvement of the phospholipase D pathway in tumor necrosis factor α synthesis. *J. Exp. Med.* 176, 9-17, 1992.
- Mollinedo, F., Burgaleta, C., Velasco, G., Arroyo, A.G., Acevedo, A. and Barasoain, I.: Enhancement of human neutrophil functions by a monoclonal antibody directed against a 19-kDa antigen. *J. Immunol.* 149, 323-330, 1992.
- Sánchez-Crespo, M., García, M.C., García, G., Gilón, M.A., Fernández-Gallardo, S. and Mollinedo, F.: Metabolic fate of platelet activating factor controlled by cellular signaling: studies on hematopoietic cell lines. In: "Platelet activating factor receptor. Signal mechanisms and molecular biology" (Ed.) Shukla, S.D., pp. 157-166. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA 1992.

Diferenciación de Linfocitos Humanos

Receptors Driving Human Lymphocyte Development

Antonio de la Hera	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico <i>Tenured Scientist</i>
Eva Sanz		Postdoctorales
Alfonso Martín-Fontecha		<i>Postdoctoral Fellows</i>
Gemma Fernández-Miguel		Predocctoral <i>Graduate Student</i>



El grupo se creó por traslado desde el *Basel Institute for Immunology* de los Drs. Sanz y de la Hera en Octubre de 1991, y acceso a un laboratorio renovado en Abril de 1992. Iniciamos entonces un programa internacional para reclutar más miembros que está aún abierto, alcanzando el grupo su configuración actual en Octubre de 1992. Queremos expresar nuestra gratitud al grupo del Dr. A. Silva por su generoso apoyo y acogida hasta el traslado al Laboratorio 345. Parte del trabajo se realizó en colaboración con los Drs. Alvarez de Mon (UAH), Alarcón (CBM-CSIC), Bluthmann (ROCHE-Basel) e Iglesias (MPI-Freiburg).

El objetivo de nuestro proyecto es el estudio de los mecanismos que regulan la proliferación y selección clonal del linaje linfoide humano, con énfasis en la función de los receptores clonales para antígeno y los factores de crecimiento y diferencia-

Our group originated with the transfer of Drs. Sanz and de la Hera from the Basel Institute for Immunology to the CIB in October '91, and was formally created together with a rebuilt laboratory in April '92. We follow an international recruitment pursuit to cover vacants. The group reaches its current size in October '92. We wish to acknowledge the support of Dr. A. Silva's group in the tumbling months that preceded our move to Lab 345. This work was partially done in collaboration with Drs. Alvarez de Mon (UAH), Alarcón (CBM-CSIC), Bluthmann (ROCHE-Basel) and Iglesias (MPI-Freiburg).

The aim of our project is to study the mechanisms that regulate the growth and clonal selection of the human lymphoid lineage, with emphasis on the function of the clonal receptors for antigen and growth

Desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de receptores relevantes al desarrollo de los linfocitos humanos.

Developing new tools to analyze the receptors driving human lymphocyte differentiation.

ción llamados interleucinas (ILs). Tanto los receptores clonales de los linfocitos T como B (TCR, Inmunoglobulinas) controlan el destino celular gracias al ensamblaje con moléculas accesorias en la transducción de señales (ej. complejos receptores TCR/CD3). Utilizando ratones transgénicos para distintas subunidades CD3 humanas, inmunoprecipitación y SDS-PAGE, inmunofluorescencia y citometría de flujo y ensayos de función, hemos desarrollado un método original que permite establecer la estequiometría y función *in vivo* de subunidades en estos receptores compuestos de múltiples cadenas asociadas por uniones no covalentes.

Así hemos demostrado que existen dos subunidades CD3ε en cada complejo TCR/CD3, contribuyendo a establecer el concepto de que existen "módulos de transducción independientes" (ej. CD3εγ, CD3εδ y ζη) en los receptores T para antígeno. Pensamos que la transducción a través de los distintos módulos pudiera explicar los estados discretos de activación, anergia ó muerte celular programada que pueden seguir al entrecruzamiento del receptor por el antígeno específico. El estudio de este modelo de trabajo requiere completar la caracterización de la estructura cuaternaria del complejo TCR/CD3 y el desarrollo de nuevos reactivos que discriminen entre los distintos módulos. En esta línea, estamos caracterizando si solo existe un sitio de unión para antígeno en el complejo TCR/CD3 ó bien éste es multivalente; y analizando ratones transgénicos y desarrollando reactivos específicos para CD3δ humano.

Tras nuestra incorporación al CIB, hemos adaptado el sistema de expresión

and differentiation factors, called interleukins (ILs). Both T and B cell receptors (TCR, Immunoglobulins) control lymphocyte fate through the assemblage with signaling accessory molecules (ej. TCR/CD3 receptor complexes). Using mice transgenic for human CD3 subunits, immunoprecipitation and SDS-PAGE, immunofluorescence and flow cytometry and function studies, we have created a novel method to define the stoichiometry and in vivo function of individual subunits within the compound clonal receptors.

Thus, we have shown that two CD3ε subunits occur within a functional TCR/CD3 complex. It has contributed to the emerging concept that T lymphocyte receptors for antigen are composed of "parallel transduction units" made of CD3εγ, CD3εδ and ζη chain pairs. The existence of distinct transduction modules might be related to activation/anergy/programed cell death response of lymphocytes upon encounter of antigen and cross-linking of the specific clonal receptors. Progress in our working model requires further definition of the quaternary structure of the TCR/CD3 complex, and development of novel reagents which are able to discriminate between modules and still signal to the cell. Along those lines we are characterizing whether the paradigm that there is a single binding site for antigen within TCR/CD3 complex holds or the antigen receptor is multivalent; and, analyzing human CD3δ transgenic mice and raising CD3δ specific antibodies.

Our group at CIB has adapted the expression system used previously to

de proteínas de fusión con dominios de inmunoglobulina utilizado previamente para producir CD3 γ -, CD3 δ - y CD3 ϵ -C κ recombinantes, a la producción de ILs quiméricas que conservan su función, y componentes del complejo receptor de inmunoglobulinas que se expresan de manera restringida en los progenitores de células B. El desarrollo de estas herramientas, como animales transgénicos, moléculas recombinantes y anticuerpos monoclonales, constituye una primera etapa en el estudio de las reglas que rigen el desarrollo de los linfocitos humanos y su posible manipulación con fines terapéuticos. □

create recombinant CD3 γ -, CD3 δ - y CD3 ϵ -C κ fusion proteins, to the production of ILs that keep their function, as well as soluble forms of components of the Immunoglobulin-receptor complex unique to B lymphocyte progenitors. The generation of the above tools, such as transgenic mice, recombinant chimeric proteins and monoclonal antibodies, constitutes a first step in our program to analyze the rules that address the development of the human immune system, and, lately, the emergence of novel manipulation possibilities with more predictable therapeutic results. □

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- CICYT: Plan Nacional I+D, SAL 90/0641 (1991-1993)
- CAM: Plan Regional de Investigación-Salud, 126/92 (1992-1994)
- Acción Especial Programación Científica del CSIC (1991-1992)

Publicaciones

Publications

- Hera, A. de la, Muller, U., Olsson, C., Isaza, S., and Tunncliffe, A.: Structure of the T cell antigen receptor: two CD3 ϵ subunits in a functional TCR/CD3 complex. *J. Exp. Med.* 173: 7-17, 1991.
- Sancho, L., Hera, A. de la., Casas, J., Vaquer, S., Martínez-A., C., and Alvarez de Mon, M.: Two different maturation stages of natural killer lymphocytes in human newborn infants. *J. Pediatrics.* 119: 446-454, 1991.
- Hera, A. de la.: Interleukins in development: is that beyond our control?. *Research in Immunol.* 141: 265-268, 1991.
- Esparza, I., Becherer, J.D., Alsenz, J., de la Hera, A., Zhuge-Lao, Tsoukas, C.D., and Lambris, J.D.: Evidence for multiple sites of interaction in C3 for complement receptor type 2 (C3d/EBV receptor, CD21). *Eur. J. Immunol.* 21: 2629-2633, 1991.
- Sanz, E., and Hera, A. de la.: Molecular structure of the B-cell antigen receptor complex. *Inflammation.* 3: 40-44, 1991.
- Hera, M. de la, Hera, A. de la, Ramos, L., Buelita, J.L. Alonso, V., Rodríguez-Valverde & J. Merino. Self-limited autoimmune disease related to transient donor B cell activation in mice neonatally injected with semiallogeneic F $_1$ cells. *Immunology.* 4: 67-74, 1992.

Diferenciación Macrofágica y Receptores de Membrana

Macrophage Differentiation and Membrane Receptors

Ignacio Bernabeu Quirante	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico <i>Tenured scientist</i>
José A. López-Guerrero José P. López-Dóiz		Investigadores Asociados <i>Associate Scientists</i>
Blanca Fernández Ruiz		Posdoctoral <i>Postdoctoral Fellow</i>
Maria Almendro Motos Teresa Bellón Heredia		Predoctorales <i>Graduate Students</i>
Carmen Langa Poza		Personal Técnico <i>Technical Staff</i>

Los monocitos periféricos de la sangre son capaces de migrar hacia los tejidos diferenciándose hacia macrófagos. Este proceso va acompañado de cambios en la expresión de antígenos de superficie, algunos de los cuales están implicados en fenómenos de adhesión celular, mientras otros actúan como receptores de factores solubles. Nosotros hemos analizado la expresión de endoglina en células monocito/macrófago humanas procedentes de distintos compartimentos y en distintos estadios de diferenciación. Endoglina es un homodímero de 180 kDa que contiene el tripéptido RGD, el cual es un elemento de reconocimiento para la familia de adhesión de las integrinas. Endoglina está ausente en monocitos periféricos, pero es expresada en la membrana de monocitos diferenciados *in vitro* hacia macrófagos. Además, existe una correlación entre la presencia de la proteína y los transcritos de mRNA que

*Peripheral blood monocytes are able to migrate and differentiate to tissue macrophages. This process is associated with changes in the expression of surface antigens, some of which are involved in cellular adhesion phenomena or behave as receptors for soluble factors. We have analyzed the expression of endoglin in human monocyte/macrophages from different tissue compartments and at different stages of cell differentiation. Endoglin is a homodimer of 180 kDa containing the tripeptide RGD, which is a recognition motif for adhesion receptors of the integrin family. Endoglin is absent from peripheral blood monocytes, but it is expressed by monocytes differentiated *in vitro*. Furthermore, there is a correlation between the presence of the protein and the mRNA transcripts encoding endoglin. Immunostaining of*

codifican para endoglina. Cuando se tiñen cortes de tejido con el anticuerpo monoclonal específico 8E11, se detecta la presencia de endoglina en los macrófagos intersticiales presentes en la pulpa roja del bazo. Utilizando como modelo de diferenciación macrófágica líneas monocíticas tratadas con ésteres de forbol, encontramos que la reactividad del anticuerpo monoclonal 8E11 de endoglina está aumentada tanto en U-937 como en HL-60 durante la diferenciación con PMA. La alta homología entre el receptor tipo III de TGF- β y endoglina, sugería que endoglina podría unir específicamente este factor. De hecho, experimentos de transfección en células de mamífero con un clon de cDNA que codifica para endoglina han demostrado que endoglina es un componente del sistema receptor de TGF- β en humanos. □

frozen tissue sections with the specific monoclonal antibody 8E11, demonstrated the presence of endoglin on the interstitial macrophages present in the red pulp of the spleen. Using as a model of macrophage differentiation monocytic cell lines treated with phorbol esters, we found that the reactivity of the monoclonal antibody 8E11, is greatly increased on U-937 and HL-60 cells during their PMA-induced differentiation. The sequence similarity between the receptor type III of TGF- β and endoglin, suggested that endoglin could possibly bind specifically this factor. In fact, transfection experiments in mammalian cells using an endoglin cDNA clone demonstrated that endoglin is a component of the human receptor system for TGF- β . □

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- DGICYT, SAL91-0507 (1991-1994)
- DGICYT, PB87-0286 (1988-1991)

Publicaciones

Publications

- Cabezas, C., Lázaro, P., Balón, T., Aller, P., Figdor, C.G., Corbi, A. and Bernabéu, G.: Induction of LFA-1 mediated homotypic adhesions in promonocytic U-937 cells occurs independently of cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1002, 155-166, 1991.
- López-Guerrero, I.A., Cabezas, C., Bernabéu, G., Fresno, M. and Alonso, M.A.: Effects of poxvirus replication on undifferentiated and differentiated monocytic U-937 cells: Comparative studies with human macrophages. *Immunology* 22, 137-146, 1991.
- Benito-Pala, R., López-Bote, J.F., Peláez, E., Larraga, V., van der Zee and Bernabéu, G.: Cellular and humoral response against the mycobacterial heat shock protein hsp65 in adjuvant arthritis susceptible and resistant Wistar rats. *Autoimmunity* 6, 1-5, 1991.

Publicaciones (continuación)

Publications (continued)

- Rius, C., A.R. Zorrilla, Cabañas, C., Mata, F., Bernabéu, C and Aller, P.: Differentiation of human promonocytic leukemia U-937 cells with DNA topoisomerase II inhibitors: Induction of vimentin gene expression. *Mol. Pharmacol.* 39, 442-448, 1991.
- Pérez-Maceda, B., López-Bote, J.P., Langa, C. and Bernabéu, C.: Antibodies to dietary antigens in Rheumatoid Arthritis. Possible molecular mimicry mechanism. *Clin. Chim. Acta* 203, 153-165, 1991.
- Lastres, P., Bellón, T., Cabañas, C., Sánchez-Madrid, F., Acevedo, A., Gougos, A., Letarte, M. and Bernabéu, C.: Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp containing surface antigen. *Eur. J. Immunol.* 22, 393-397, 1992.
- Ramos-Ruiz, R., Avila, J., López-Bote, J.P., Bernabéu, C. and Larraga, V.: Decreased tubulin synthesis in synoviocytes from adjuvant-induced arthritic rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1138, 184-190, 1992.
- Gougos, A., Jacques, S.St., Greaves, A., O'Connell, P.J., d'Apice, A.J.F., Bühring, H.J., Bernabéu, C., van Mourik, J.A. and Letarte, M.: Identification of distinct epitopes of endoglin, a protein of endothelial cells, leukemic cells and syncytiotrophoblasts. *Int. Immunol.* 4, 83-92, 1992.
- Ramos-Ruiz, R., Bernabéu, C., Ariza, A., Fernández, J.M., Larraga, V. and López-Bote, J.P.: Arthritis transferred by cells derived from pre-inflammatory rat synovium. *J. Autoimmunity* 5, 93-106, 1992.
- Aller, P., Rius, C., Mata, F., Zorrilla, A., Cabañas, C., Bellón, T. and Bernabéu, C.: Camptothecin induces differentiation and stimulates the expression of differentiation-related genes in U-937 human promonocytic leukemia cells. *Cancer Res.* 52, 1245-1251, 1992.
- Cheifetz, S., Bellón, T., Calés, C., Vera, S., Bernabéu, C., Massagué, J. and Letarte, M.: Endoglin is a component of the TGF- β receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 19027-19030, 1992.

Genética del Sistema del Complemento

Genetics of the Complement System

Santiago Rodríguez de Córdoba (Jefe de Grupo) Personal Científico
(Group leader) *Tenured Scientist*

Javier Rey Campos

Investigador Contratado
Tenure-track Scientist

Ricardo Ramos Ruiz
Pilar Sánchez-Corral

Postdoctorales
Postdoctoral Fellows

Natalia Arenzana Arias
Fernando Pardo-Manuel

Predoctorales
Graduate Student

M^a Soledad Vara de Rey

Personal Técnico
Technical Staff



El complemento es el mecanismo efector humoral más importante de la defensa natural o inespecífica. El sistema del complemento debe en gran medida la eficacia de su papel en la defensa del organismo a la existencia de toda una serie de proteínas reguladoras que, además de garantizar la homeostasis del sistema, protegen a los componentes propios del daño accidental que la activación del complemento pudiera causarles. La mayoría de estos componentes reguladores pertenecen a la misma familia de proteínas y sus genes están estrechamente ligados en el agrupamiento genético conocido como sistema RCA. El sistema RCA humano está localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q32) y contiene los genes que codifican los componentes reguladores *Membrane cofactor protein* (MCP, CD46), *C3b/C4b-receptor* (CR1, CD35), *C3dg-receptor* (CR2, CD21), *Decay accelerating factor* (DAF, CD55), *C4b-binding*

*The complement system is a major defense mechanism against the infection by microorganisms in the bloodstream. Complement activation is strictly controlled by a large number of regulatory components which maintain the homeostasis of the system and prevent the nonspecific damage to self components nearby the activation site. Most of these components belong to the same family of proteins and are encoded by closely linked genes which define the so-called regulator of complement activation (RCA) gene cluster. The human RCA gene cluster is located in the long arm of chromosome 1 (1q32). It includes the genes for the regulatory complement components *Membrane cofactor protein* (MCP, CD46), *C3b/C4b-receptor* (CR1, CD35), *C3dg-receptor* (CR2, CD21), *Decay accelerating factor* (DAF, CD55), *C4b-binding protein* (C4BP) and*

protein (C4BP) y Factor H (H). Los genes del RCA se originaron a partir de un ancestro común mediante múltiples eventos de duplicación genética implicando seguramente recombinaciones desiguales.

En la actualidad nuestro laboratorio trabaja en distintos aspectos de la biología del sistema RCA, incluyendo: i) Cartografía genética del sistema RCA y caracterización de nuevos genes en esta localización genética; ii) Estudio comparativo de la evolución molecular del sistema RCA; iii) Una subregión del sistema RCA ha sido exhaustivamente analizada en nuestro laboratorio. Esta región incluye los genes que codifican las dos cadenas polipeptídicas que organizan la glicoproteína plasmática humana C4BP. Nuestro laboratorio está especialmente interesado en el estudio de los mecanismos moleculares (transcripcionales y post-transcripcionales) que regulan la expresión de estos genes. □

Factor H (H). The members of the RCA gene cluster have originated from a common ancestor by multiple events of gene duplication, most likely involving unequal recombination.

Current research in our laboratory approaches several aspects of the biology of the RCA gene cluster. Our objectives include: i) The completion of the genetic map of this region in humans, including the characterization of novel genes within the RCA gene cluster; ii) Analysis of the molecular evolution of the RCA gene cluster and comparative studies; iii) A particular subregion of the RCA gene cluster has been extensively analyzed in our laboratory. This region includes the C4BPA and C4BPB genes, which code for the two polypeptides that organize the human plasma glycoprotein C4BP. The interest of the laboratory focuses in the molecular analysis of the mechanisms (transcriptional and post-transcriptional) controlling the expression of C4BPA and C4BPB genes in humans. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- DGICYT, PM89-0013 (1990-1992)
- FISS, 92/0889 (1992-1994)
- CAM, 155/92 (1993-1994)

Publicaciones

Publications

- Rodríguez de Córdoba, S., Sánchez-Corral, P. and Rey-Campos, J.: Structure of the gene coding for the alpha polypeptide chain of the human complement component C4b-binding protein. *J. Exp. Med.* 173, 1073-108, 1991.
- Rodríguez de Córdoba, S. and Vivanco, F.: Complemento. In: *Medicina Interna (12th Edition)*. (Eds.) Ferreras and Rozman, pp. 2833-2840, 1991.
- Fernández-Ruiz, E., Rubio, M. A., Corbi, A. L., Pardo-Manuel de Villena, F., Rodríguez de Córdoba, S. and Sánchez-Madrid, F.: Mapping of the human VLA-a4 gene to chromosome 2q31-2q32. *Eur. J. Immunol.* 22, 587-590, 1992.
- Velasco, E., Sánchez-Corral, P., Moreno, F. and Rodríguez de Córdoba, S.: Dinucleotide repeat polymorphism between the human C4BPA and C4BPB gene loci (1q32). *Hum. Mol. Genet.* 1, 552, 1992.

Genética Humana

Human Genetics

José A. Abrisqueta Zarrabe	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientists
Pilar Alonso Sanjuan		
Vitalino Alier Racimo		Investigador Asociado Associate Scientist
M^a Amparo Cerrajero Hernández		Personal Técnico Technical Staff
Cristina Iglesias Guisasaola		
M^a Teresa Zorita González		

Dislexia: Estudio de su posible etiología genética

Dyslexia: Study of its possible genetic basis.

Se ha continuado el estudio sobre la posible base genética de la dislexia, de acuerdo con el diseño del Proyecto presentado. La selección de la muestra se ha efectuado en colaboración con el Centro de Estudios de Aprendizaje y Reeducción de Madrid. Pese a las limitaciones por falta de colaboración de algunas familias, se han reunido en este segundo año de realización del Proyecto 38 nuevos probandos. Hasta el momento, tenemos 21 familias, aunque no todos sus miembros han podido ser estudiados. Entre los resultados de los análisis citogenéticos cabe señalar que 21 individuos son portadores de algún heteromorfismo. De nuevo, la var(15)(p11,C30) es la más significativa. Con bandas de alta resolución destaca también la var(19)(p12). La forma de transmisión de esta discapacidad dentro de las fratrias es absolutamente compatible con una herencia autosómica dominante. Finalmente, en el estudio dermatoglí-

According to the proposal of the presented project, we have continued the study on the putative genetic basis of dyslexia. The sample selection has been brought about in collaboration with the Centro de Estudios de Aprendizaje y Reeducción. In spite of some drawbacks due to the scarce or null collaboration of several families, we have succeeded in gathering 38 new probands in this second year of fulfillment of the project. For the moment, we have got 21 families, although some of their members remain still unstudied. From the cytogenetic studies it is worth mentioning that 21 individuals are carriers of some kind of heteromorphism. The most significant variant is again var(15)(p11,C30). After high resolution banding it is appropriate to underline the presence of var(19)(p12). The mode of inheritance of that disability within the fratries is fully compatible with and autosomal dominant trait. Finally, after the dermatoglyphic analysis, an increase in the

fico, se advierte un incremento del valor dactilar total entre los probandos que presentan algún tipo de heteromorfismo. Al final del trabajo, se hará una valoración estadística de estos datos parciales. □

total finger ridge count is observed in the probands with some type of heteromorphism. A statistical analysis will be performed at the end of the study once all the partial data will be brought together. □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- FISs (1991-1993)
- Fundación Centro de Estudios de Aprendizaje y Reeducción

Publicaciones Publications

- Tapia, M.C., Cadavid, R., Jordá, J.V., Abrisqueta, J.A., y Diezola, F.: Consejo genético en Otolología. en: *Malformaciones genéticas de oído y su tratamiento*. Eds. Genel, S.A. Madrid, pgs. 219-232, 1991.
- Abrisqueta, J.A.: Síndrome de Down: Aspectos genéticos. *Madrid Bot. Asoc. Sind. Down*, Madrid nº1, 4-5, 1991.
- Abrisqueta, J.A.: Trisomía 21: Origen materno o paterno. *Madrid* nº2, 7, 1991.
- Abrisqueta, J.A., Alonso, P., Alar, V., e Iglesias, C.: Base genética de la dislexia. *An. Real Acad. Farmacia* 56, 59-93, 1992.
- Abrisqueta, J.A.: Prevención de las deficiencias: Consejo genético. *Act. Ped. Esp.* 50, 501-504, 1992.
- Abrisqueta, J.A.: El embrión humano: Estatuto antropológico y ético. En: *Conceptos Fundamentales de Ética Tecnológica*. Eds. Tróts, S.A. Madrid, 439-455 (1992).
- Abrisqueta, J.A.: Síndrome de Down: Aspectos genéticos. *ASNDOWN* 1, 5-7, 1992.
- Alonso, P.: Demostración de la cromatina difusa ("puff") en las transcritas poliméricas de *Styriophila pallida* (Phlebotomidae). *Rev. Real Soc. Españ. HF Natur. (Sec. Biología)*, 1992.

Epitopos Funcionales de Proteínas de Superficie Celular y Citoesqueleto

Functional Epitopes of Cell Surface and Cytoskeletal Proteins

Isabel Barasoain Blasco	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Concepción de Ines Díaz		Predoctoral Graduate Student
Santiago Abarca Hernaiz (1992)		Personal Técnico Technical Staff



1) Caracterización de proteínas de la superficie celular de neutrófilos humanos. Se ha obtenido un panel de anticuerpos monoclonales frente a neutrófilos y con ellos se está estudiando nuevos antígenos que podrían ser de gran utilidad para la identificación de determinados tipos celulares en procesos patológicos, así como marcadores de distintos estados de diferenciación mielóide.

2) Epítomos funcionales de proteínas del citoesqueleto. Se han preparado anticuerpos monoclonales frente a ocho péptidos sintéticos correspondientes a secuencias conservadas de la molécula de α y β tubulina, con los que se pretende determinar zonas funcionales de esta molécula implicadas en la formación de microtúbulos y su interacción con otros componentes celulares. □

1) *Human neutrophil cell surface proteins. A panel of monoclonal antibodies against human neutrophils has been generated and with them we are studying new antigens that could be useful to identify pathological processes and as markers of different phases of myeloid differentiation.*

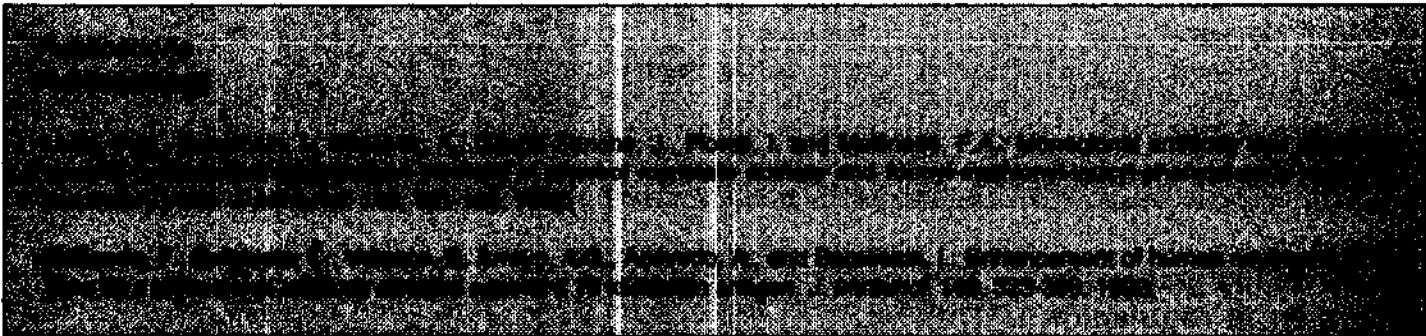
2) *Functional epitopes of cytoskeletal proteins. We have prepared monoclonal antibodies against eight synthetic sequences of α and β tubulin in order to determine functional epitopes of this molecule involved in microtubule formation and in its interaction with other cellular components. □*

Científicos Invitados
Invited Scientists

- Daniel Leynadier (Oct. 91, Nov. 92)
- Patrick García (Feb. 91)

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- DGICYT, PB87-0230 (1989-1993)
- DGICYT, PM89-0003 (1990-1993)



Regulación de la Expresión de Genes del Sistema Inmune

Regulation of Gene Expression in the Immune System

Augusto Silva González	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Enric Espel (1991)		Postdoctoral Postdoctoral Fellow
Mónica Lamas Gregori Francisco Ramírez Jiménez		Predoctorales Graduate Student
Carlos Rodríguez		Pregraduado Undergraduate Student
Juana María López Vera		Personal Técnico Technical Staff



Acción de los glucocorticoides en la regulación de la expresión de estructuras de superficie de linfocitos T: El receptor de interleucina 2 y el receptor de CD8.

Regulation of interleukin 2 receptor a gene and CD8 antigen by glucocorticoids.

Nuestro proyecto de investigación está relacionado con la acción de los glucocorticoides sobre los linfocitos T y más concretamente sobre el receptor de IL-2 (IL-2R) y la regulación de la estructura CD8. Así, observamos como los glucocorticoides pueden actuar sinérgicamente con la IL-2 sobre los receptores de IL-2 potenciando su expresión en la superficie celular, así como seleccionando a determinadas poblaciones linfocitarias.

El efecto de los glucocorticoides sobre la regulación de la cadena a del IL-2R. Durante el presente año hemos trabajado sobre tres aspectos concretos en cuanto a la regulación del receptor de IL-2. En primer lugar caracterizamos el efecto del tratamiento con glucocorticoides sobre el ARNm del IL-2Ra mediante ensayos de protección a RNasa. Observamos un incremento en los niveles de ARNm que sugieren la existencia de

During the last year our work has been focused on the role of glucocorticoids on the expression of IL-2Ra gene and the cell surface antigen CD8. In this context, we observed a synergistic effect between glucocorticoids and IL-2 on the expression of the IL-2Ra gene and the selection of specific lymphoid populations.

IL-2 Receptor gene expression regulation by glucocorticoids. Our work has been focused on three specific aspects of the IL-2R gene expression regulation. We first characterised the effect of glucocorticoids on IL-2Ra mRNA steady state levels by means of RNase protection analysis. On three different T cell lines we were able to show an induction of mRNA levels that suggests the existence of a glucocorticoid-mediated

un mecanismo de regulación transcripcional.

Analizamos también la localización a nivel del promotor de la cadena α de IL-2R de los "elementos de respuesta a glucocorticoides" (GRE). Mediante la utilización de transfecciones de linfocitos T con plásmidos conteniendo fragmentos de la región promotora del IL-2R α dirigiendo la transcripción del gen CAT, localizamos este GRE entre las bases -1200 y -1500. Este fragmento de 290 bp situado delante de un promotor mínimo heterólogo puede regular la expresión del gen CAT. En esta misma región, alrededor de la base -1300 bp, localizamos regiones de hipersensibilidad a DNasa I, que están asociadas a zonas reguladoras dentro de la región promotora.

Efecto de los glucocorticoides en la expresión de la cadena CD4 en células T. Concentraciones mitogénicas de Con A inducen la proliferación tanto de poblaciones CD4 como de CD8. El tratamiento simultáneo de Con A con el glucocorticoide dexametasona, induce un fuerte aumento de una población minoritaria CD4/CD8. Esta población es consecuencia de la inducción del antígeno CD8 sobre la población CD4, a través de la dexametasona. Nuestros estudios demuestran que esta inducción no es debida a la interleucina-4, que había sido descrito como agente responsable de esta inducción del antígeno CD4 en células T humanas. □

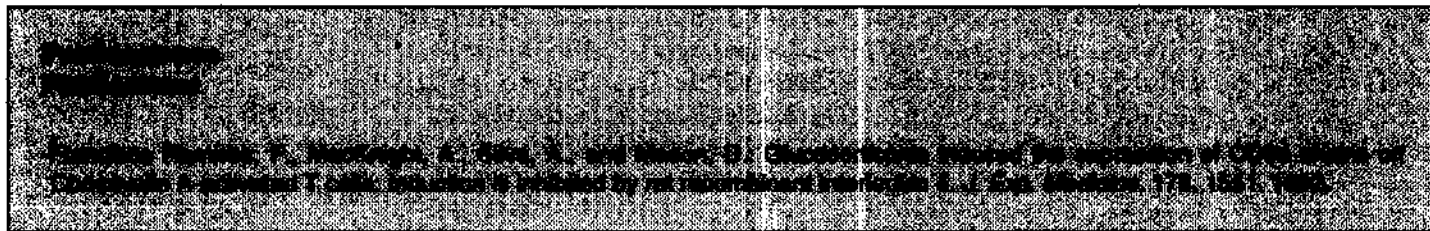
mechanism of transcriptional regulation.

We analyzed the presence of "glucocorticoid responsive elements" (GRE) in the 5' flanking region of the IL-2R α gene. Transient transfection of plasmids containing different fragments of these region driving the expression of the CAT reporter gene allowed the identification of a putative GRE in position -1200/-1500. This 290 bp long fragment is able to confer glucocorticoid inducibility to an heterologous promoter. In the same region of the IL-2R α 5' flanking region we identified a glucocorticoid-inducible DNase I hypersensitive site that further supports the relevance of this short fragment in the regulation of expression of the IL-2R α gene.

Effect of glucocorticoids in the expression of CD4 chain on T cells. Mitogenic concentrations of Con A induce the proliferation of CD4 and CD8 cells. Simultaneous treatment with Con A and the glucocorticoid dexamethasone induces a strong increase of a CD4/CD8 population. This is a consequence of the induction of the CD8 antigen over the CD4 population due to the action of dexamethasone. Our work shows that this induction is not due to IL-4 that had been reported to be responsible of the induction of CD4 antigen in human T cells. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- Fundación Ramón Areces, (1990-1993)
- DGICYT, (1991-1993)
- CAM, (1991-1994)



Adhesión Celular en el Sistema Immune

Cell Adhesion in the Immune system

Angeles García Pardo

Jefe de Grupo
(Group leader)

Personal Científico
Tenured Scientist

Paloma Sánchez Aparicio

Carmen Domínguez Jiménez

Predoctorales
Graduate Students

Ana Gutiérrez

(Desde V-1991)

Personal Técnico
Technical Staff



Las interacciones de los leucocitos con la matriz extracelular son fundamentales para la migración y localización de estas células en tejidos y en sitios de inflamación, así como para su normal desarrollo y función. En nuestro laboratorio nos hemos centrado en la caracterización de la adhesión celular al componente de matriz fibronectina. Hemos demostrado que las células linfoides se unen constitutivamente a dos sitios de la región carboxilo-terminal de fibronectina, llamados CS-1 y Hep II. Hemos demostrado también que el receptor celular que reconoce ambas regiones de fibronectina es la integrina $\alpha 4\beta 1$. Actualmente estamos estudiando el comportamiento de otras células hematopoiéticas con respecto a la adhesión a fibronectina. Nuestros resultados indican que las células monocíticas y los linfocitos de sangre periférica, reconocen constitutivamente el

Leukocyte interaction with the extracellular matrix is essential to their proper migration and localization in tissues and inflammatory sites, as well as to their function. Our studies have focused on the molecular characterization of leukocyte adhesion to the extracellular matrix component fibronectin. We have shown that lymphoid cells constitutively attach to two different sites in the carboxy terminal region of fibronectin, named CS-1 and Hep II. We have also shown that the cellular receptor that recognizes both sites in fibronectin is the $\alpha 4\beta 1$ integrin. We have now extended these studies to other hematopoietic cells. Our results indicate that monocytic cells and peripheral blood lymphocytes constitutively bind CS-1 but require further

Interacciones de linfocitos y monocitos con la matriz extracelular.

Lymphoid and monocytic cell interactions with the extracellular matrix.

sitio CS-1 pero la unión a Hep II requiere una previa activación del receptor. Esta activación se puede conseguir por incubación con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cadena b1. Hemos demostrado que este anticuerpo produce un cambio conformacional en a4b1 que se traduce en una forma de alta afinidad de esta integrina. Actualmente estamos estudiando si el cambio al estado más activado conlleva también cambios en la especificidad de a4b1 por sus ligandos. Asimismo tratamos de determinar el/los estímulos fisiológicos que activan esta integrina. También estudiaremos las posibles diferencias estructurales entre la integrina a4b1 de células linfoides y monocíticas. La existencia de diferentes estados de activación de a4b1 en diferentes tipos celulares así como la posible interconversión de un estado a otro, establece otro nivel de regulación de los procesos de adhesión celular. □

activation of the receptor for binding to Hep II. Such activation can be achieved by incubation with a monoclonal antibody directed to the b1 integrin chain. We have shown that this antibody induces a conformational change on a4b1 which results in a high affinity form of this integrin. We are presently studying whether conversion to the activated form also affects a4b1 ligand specificity. Furthermore we are trying to identify the physiological stimuli which activate a4b1. We will also study possible structural differences between a4b1 on lymphoid and monocytic cells. The existence of different activation states on a4b1 according to the cell type, and the possible interconversion among them, adds another level of regulation to the process of cell adhesion. □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- DGICYT, SAL 91-0785, (1991-1994).
- CAM, (1993 - 1994).
- Acción Especial Programa Científico del CSIC (1991)

Publicaciones

Publications

- Ferreira, D. C., Valinsky, J. E., Sheridan, K., Wayner, E. A., Bianco, C., and Garcia-Pardo, A.: Phorbol ester-induced differentiation of U937 cells enhances attachment to fibronectin and distinctly modulates the $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha 4 \beta 1$ fibronectin receptors. *Exp. Cell Res.* 193: 20-26, 1991.
- Pulido, R., Elices, M. J., Campanero, M. R., Osborn, L., Schiffer, S., Garcia-Pardo, A., Lobb, R., Hemler, M. E., and Sanchez-Madrid, F.: Functional evidence for three distinct and independently inhibitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4: Correlation with distinct $\alpha 4$ epitopes. *J. Biol. Chem.* 266: 10241-10245, 1991.
- Postigo, A. A., Pulido, R., Campanero, M. R., Acevedo, A., Garcia-Pardo, A., Corbi, A. L., Sánchez-Madrid, F., and O. de Landáuzuri, M.: Differential expression of VLA-4 integrin by resident and peripheral blood B lymphocytes. Acquisition of functionally active $\alpha 4 \beta 1$ receptors upon B cell activation. *Eur. J. Immunol.* 21: 2437-2445, 1991.
- Pulido, R., Campanero, M. R., Garcia-Pardo, A., and Sánchez-Madrid, F.: Structure-function analysis of the human integrin VLA-4 ($\alpha 4 \beta 1$): Correlation of proteolytic $\alpha 4$ peptides with $\alpha 4$ epitopes and sites of ligand interaction. *FEBS Lett.* 294: 121-124, 1991.
- Roldán, E., Garcia-Pardo, A., and Brieva, J. A.: VLA-4-fibronectin interaction is required for the final differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high-rate Ig secretion. *J. Exp. Med.* 175: 1739-1747, 1992.
- García-Pardo, A., Sánchez-Aparicio, P., and Wayner, E. A.: Two novel monoclonal antibodies to fibronectin that recognize the Hep II and CS-1 regions respectively: their differential effect on lymphocyte adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 135-142, 1992.

Metabolismo y Patología Molecular

Metabolism and Molecular Pathology

Roberto Parrilla Sánchez	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientists
Angeles Martín Requero Matilde Sánchez Ayuso		
Consuelo González Manchón Nora Viviana Butta		Postdoctorales Postdoctoral Fellows
Guadalupe Ciprés Palacín Milagros Ferrer Aldea Dolores Ibarreta Ruiz Teresa Cristalina Rivas Calleja Elena Urcelay García		Predoctorales Graduate Students
M. José Arias-Salgado Rosby M. Asunción González González Ana María Rodríguez Monge		Personal Técnico Technical Staff

1. Regulación del metabolismo hepático

Los objetivos fundamentales de este proyecto son: **a)** Caracterización de la respuesta hepática a la activación de α -adrenoreceptores. En particular se intenta determinar el papel de la activación de los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en el mecanismo de transducción de señales mediadas por receptores α , y la implicación de proteína(s) G sensibles a toxina pertussis. **b)** Interrelación entre gluconeogénesis y ureogénesis. Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio del papel que juega la activación del flujo a través de piruvato deshidrogenasa en la estimulación de ureogénesis por substratos gluconeogénicos.

1. Regulation of hepatic metabolism

This project aim is to study: **a)** The hepatic response to α -adrenoreceptors activation. The idea is to elucidate the role of the plasma membrane Na^+/H^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in the hepatic α -adrenoreceptor-coupled signalling pathway, as well as the implication of receptor-specific pertussis toxin sensitive G proteins. **b)** Interrelationship between gluconeogenesis and ureogenesis. This research is oriented to elucidate the role played by pyruvate dehydrogenase flux in the regulation of ureogenesis by gluconeogenic precursors.

2. Regulación de la síntesis de proteínas hepáticas por aminoácidos.

El objetivo principal de este proyecto es determinar el mecanismo(s) de la estimulación de síntesis de proteínas por aminoácidos. Este proyecto comprende el estudio de los siguientes mecanismos como posibles responsables de la acción de alanina y prolina: 1) fijación a ribosomas de proteínas específicas; 2) expresión de genes que codifican proteínas ribosomales; y 3) perturbaciones del medio iónico intracelular.

3. Relación estructura-función de proteínas de interés fisiopatológico.

Los objetivos principales de este proyecto son el estudio de: **a)** Relación estructura-función de la proteína c-erbAb humana, que es un receptor de alta afinidad de hormonas tiroideas. **b)** Correlación estructura-función de la integrina GPIIb/GPIIIa, receptor plaquetario de fibrinógeno. **c)** Estructura del gen que codifica la proteína precursora de sustancia amiloidea (APP) en pacientes con enfermedad de Alzheimer. □

2.-Regulation of hepatic protein synthesis by alanine.

The main goal of this project is to determine the mechanism(s) of action of amino acids in the stimulation of protein synthesis. This research involves the study of the following mechanisms as responsible of the alanine and proline action 1) ribosomal binding of specific proteins; 2) expression of genes encoding ribosomal proteins and 3) perturbations in the ionic composition of the intracellular compartment.

3. Structure-function relationship of proteins with physiopathological interest.

The main goals of this project are: a) Structural-functional relationship of the c-erbAb protein, that is a high affinity receptor of thyroid hormones. b) Structural-functional relationship of the GPIIb/GPIIIa integrin, platelet fibrinogen receptor. c) Structural study of the gene encoding the amyloid precursor protein (APP) in patients of Alzheimer's disease. □

Organismos financiadores

Funding Agencies

- DGICYT, PB87-0280, (1988-1992)
- CAM, C249/90 y C142/92, (1990-1995)
- DGICYT, SAL90-0766, (1991)
- CAM, C071/91, (1992-1994)
- DGICYT, SAL509/91, (1992-1994)
- Fundación Eugenio Rodríguez (1992)

lógicos en el páncreas, cerebro y glándula pituitaria; y 3) para el mapeo detallado, por técnicas inmunocitoquímicas, de la localización intracerebral del péptido y sus neuronas diana. □

brain and pituitary, and 3) to map the detailed intracerebral localization of the peptide and its target neurons by immunocytochemical techniques. □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- DGICYT, PM89-0005 (1989-1991)
- DGICYT, PB90-0532 (1992-1993)
- Fundación Eugenio Rodríguez Pascual (1992-1994)

Publicaciones Publications

- García Hermida, O., Fontela, T., Ghiglione M., and Uttenenthal, L.O.: Effect of pertussis toxin pretreatment on plasma glucose and insulin responses to lithium in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1309-1312, 1991.
- Fontela, T., García Hermida, O., Mena, M.A., and Uttenenthal, L.O.: Effect of acute lithium administration on plasma catecholamines in rats. *Lithium* 2, 185-187, 1991.
- Uttenenthal, L.O., Toledano, A., and Blázquez, E.: Autoradiographic localization of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36) amide in rat brain. *Neuropeptides* 21, 143-146, 1992.

Proliferación y diferenciación de células mieloides

Proliferation and differentiation of myeloid cells

Patricio Alier Tresguerres	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Nuria Vilaboa Díez		Predoctoral Graduate Student
Alicia Ballester Jareño		Pregraduado Undergraduate Student
Francisco Pelayo Cortines Carlos Cabañas Gutiérrez		Investigador Asociado Associated Scientist
Elena de Bias Brotons		Personal Técnico Technical Staff

Nuestro grupo desarrolla un programa de investigación sobre proliferación y diferenciación de células mieloides. Como sistema biológico, se utilizan fundamentalmente líneas celulares leucémicas humanas, en concreto: células promonocíticas U-937 y THP-1; células mielomonocíticas HL-60 y KG-1, y células eritroblastoides K562 y HEL. Mantenemos dos proyectos principales de trabajo:

1. Análisis de la expresión de genes posiblemente implicados en la diferenciación, especialmente en el linaje monocítico-macrofágico, bien sea como reguladores del disparo del proceso o como determinantes del fenotipo maduro final. Hasta el momento nos hemos centrado principalmente en la expresión de genes de proteínas de filamentos intermedios (vimentina y láminas nucleares), a nivel de RNA y proteína. Actualmente estamos extendiendo nuestro estudio a otros

We are currently working on the proliferation and differentiation of myeloid cells. As a biological system, we use human leukaemia cell lines such as: U-937 and THP-1 promonocytic cells, HL-60 and KG-1 myelomonocytic cells, and K562 and HEL erythroblastoid cells. Our two main projects are:

1. Analysis of the expression of genes possibly involved in cell differentiation, specially in the monocyte-macrophage pathway, either by regulating the process trigger or by determining the establishment of the mature phenotype. Until now our attention has been mostly focused on the expression of intermediate filament protein genes (vimentin, nuclear lamins), at the RNA and protein levels. We are extending the study to other genes, such as

genes, tales como los oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *c-jun β* , *c-myb*, *c-myc*, *c-fms*, genes de proteínas de estrés *hsp70* y *hsp65*, y genes de citoquinas *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*. Se utilizan inductores de la diferenciación con distinto mecanismo de acción.

2. Análisis de la capacidad de agentes citostáticos antineoplásicos para inducir la maduración de células mieloides leucémicas cuando se aplican a concentraciones subcitotóxicas. Este trabajo puede tener un especial interés práctico en términos de la denominada "terapia de diferenciación". Hasta el momento hemos caracterizado la acción de algunos agentes con actividad anti-DNA topoisomerasa, tales como amsacrina (mAMSA), etopósido (VP-16) y camptotecina. Estamos analizando los mecanismos responsables de la diferenciación por tales agentes, y estudiando la acción de otros citostáticos. □

c-fos, c-jun, c-jun- β , c-myb, c-myc and c-fms oncogenes; hsp70 and hsp65 stress protein genes, and genes of certain cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Differentiation inducers with diverse mechanism action are used.

2. Analysis of the capacity of cytostatic antineoplastic agents to induce myeloid leukaemia cell maturation when used at subcytotoxic concentrations. This line of research has a practical interest since it falls under the field of the "differentiation therapy". Until now we have characterised the action of some anti-DNA topoisomerase agents, such as amsacrine (mAMSA), etoposide (VP-16) and camptothecin. We are now investigating the factors responsible for differentiation induced by these agents, and extending the study to the action of other cytostatic drugs. □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- DGICYT, PB87-0351 (1988-1992)
- DGICYT, PB91-0062 (1992-1995)

Publicaciones Publications

- Rlus, C., Zorrilla, A., Cabañas, C., Mata, F., Bernabeu, C. and Aller, P.: Differentiation of human promonocytic leukemia U937 cells with DNA topoisomerase II inhibitors: induction of vimentin gene expression. *Mol. Pharmacol.* 39, 442-448, 1991.
- Cabañas, C., Lastres, P., Bellón, T., Aller, P., Figdor, C.G., Corbi, A. and Bernabeu C.: Induction of LFA-1 mediated homotypic adhesion in promonocytic U937 cells occurs independently of cell differentiation. *Biochem. Biophys. Acta* 1092, 165-168, 1991.

Publicaciones (continuación)

Publications (continued)

- González-Fernández, A., Aller, P., Sans, J., and De la Torre, C.: Early and late replicating DNA involved in the G₁ to S transition in *Allium cepa* L. meristem cells. *Biol. Cell.* 74, 243-247, 1992.
- Leal, M.A., Cabañas, C., Rius, C., Aller, P., and Calle, P.: Modulation by dexamethasone of insulin binding and insulin receptor mRNA levels in U-937 human promonocytic cells. *Biochimie* 74, 545-549, 1992.
- Rius, C., and Aller, P.: Vimentin expression as a late event in the *in vitro* differentiation of human promonocytic cells. *J. Cell Sci.* 101, 395-401, 1992.
- Aller, P., Rius, C., Mata, F., Zorrilla, A., Cabañas, C., Bellón, T., and Bernabeu, C.: Camptothecin induces differentiation and stimulates the expression of differentiation-related genes in U-937 human promonocytic leukemia cells. *Cancer Res.* 52, 1245-1251, 1992.
- González-Fernández, A., Sans, J., Aller, P., and De la Torre, C.: The involvement of discrete genome regions in post-mitotic chromosome decondensation and in G₁ timing in *Allium cepa* L. meristematic cells. *J. Cell Sci.* 103, 1047-1051, 1992.
- Calle, C., Cabañas, C., Leal, A., and Aller, P.: Expresión del gen del receptor de insulina. Implicaciones fisiopatológicas. *Avances en Diabetología* 3, 68-70, 1991.
- Calle, C., Vilaboa, N.E., Bernabeu, C., and Aller, P.: Controversia actual sobre la participación de las proteínas de estrés en los procesos de autoinmunidad de la diabetes mellitus tipo I. *Endocrinología* 39, 23-27, 1991.

Regulación de la Expresión Génica en Mamíferos

Regulation of Gene Expression in Mammals

Miguel Angel Vidal
(Desde 1-1992)

(Jefe de Grupo)
(Group leader)

Personal Científico
Tenured Scientist

María Rosa de la Colina
(Desde 1-1992)

Predocctoral
Graduate Student

Los experimentos de transferencia de genes y la caracterización de mutaciones naturales, muestran la relevancia de la organización de la cromatina en dominios cromosómicos para la regulación de la actividad génica. Las secuencias de DNA que determinan la estructura de la cromatina en esos dominios, así como sus bordes, constituyen un nuevo tipo de elementos genéticos. A diferencia de los elementos de control mejor conocidos hasta ahora (promotores, *enhancers* y otros elementos locales así denominados porque afectan sólo al gen asociado) este nuevo tipo de elementos afectan a todos los genes contenidos en el dominio cromosómico. La identificación de nuevos elementos de este tipo y su contribución a la regulación de la expresión génica durante el desarrollo son temas de particular interés.

En este proyecto (iniciado anteriormente, en el CIEMAT), nosotros estamos utilizando la familia de genes de queratinas (las proteínas constituyentes del citoesqueleto de filamentos intermedios de las células epiteliales) para estudiar:

1. Expresión génica en estadios tempranos del desarrollo en ratón: la querati-

Both, gene transfer experiments and the analysis of naturally occurring mutations, have shown that the organisation of the chromatin in domains is of special relevance to the regulation of gene activity. The DNA sequences that determine the structure of the chromatin in those domains, as well as their boundaries, define a new class of genetic elements. Thus, whereas promoters, enhancers, and other so-called local elements, affect only the associated transcriptional unit, this novel class of regulatory elements affect all genes contained in the chromosomal domain. The contribution of these control elements to the developmental regulation of gene expression is of particular interest.

To address these questions we are using the multigene family of the keratins (the proteins that make the intermediate filament cytoskeleton of epithelial cells) in a project initiated at the CIEMAT. Three main experimental lines are being followed:

1. Gene expression in early mouse development: the keratin 8 is expressed in the first differentiated cell

na K8 se expresa en el primer tipo celular que aparece en el desarrollo (trofoblasto), así como en los tejidos extraembrionarios del embrión postimplantado.

2. Rastreo del locus de queratinas de tipo II para la identificación de elementos de control de dominio cromosómico.

3. Modificaciones específicas de genes *in vivo* a través de recombinación homóloga. El proyecto inicial persigue la obtención de mutaciones en el gen de la queratina K5. Este gen está asociado a enfermedades de la piel en humanos (epidermolisis bullosa) y por ello podría resultar en un modelo animal de la enfermedad. □

type that comes up in development (the trophoblast), as well as in the extraembryonic tissues of the postimplantation embryo.

2. Screening of the keratin type II locus for the presence of locus control regions.

3. Mutations in control elements by gene targeting. This project deals initially with the generation of mutations in the gene for keratin 5, which is involved in a skin disease (epidermolysis bullosa simplex) and, therefore, may provide an animal model of the disease. □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- Acción Especial Programa Científico del CSIC (1991)
- CICYT, PB89-0389, (1992)
- Fundación Ramón Areces (1991-1993)
- CICYT, PB90-0111, (1992-1994)

Publicaciones Publications

-Barboni, E., Gormley, A. M., Pliego Rivero, F. B., Vidal, M. and Morris, R. J.: Activation of T lymphocytes by cross-linking of glycophospholipid anchored Thy-1 mobilizes separate pools of intracellular second messengers to those induced by the antigen-receptor/CD3 complex. *Immunology* 72:457-463, 1991.

Biología de la Reproducción

Biology of Reproduction

Pedro Esponda Fernández	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
María Rosa Carballada Díaz Enrique Gómez-Lahoz Rufino Felto Tapia		Postdoctorales Postdoctoral Fellows
Jorge Cuadros Fernández Marta Riffo Duarte		Predoctorales Graduate Students
Marta Moreno González Mario Párraga San Román		Pregraduados Undergraduate Students

Nuestro grupo está interesado en esclarecer las funciones de algunas proteínas secretadas por los tractos genitales o presentes en la membrana plasmática de los gametos, las que tendrían una participación importante en el mecanismo reproductivo de los mamíferos. El trabajo pretende centrarse en el análisis de tres tipos de proteínas: **A)** La fosfolipasa A2, una enzima relacionada con los fenómenos de exocitosis es estudiada respecto a su probable participación en el fenómeno de reacción acrosomal y a su posible implicación en la fusión de membranas que ocurre entre el espermatozoide y el oocito durante la fecundación. **B)** Algunas proteínas del fluido de vesícula seminal de rata (en particular aquellas de 45 y 18,5 kDa) son analizadas a fin de conocer el papel que tendrían en el transporte de espermatozoides y en los fenómenos que ocurren antes y durante la fecundación. **C)** La uteroglobina, proteína secretada por el tracto femenino, es estudiada utilizando animales transgénicos (creados mediante construcciones del gen de conejo) con el propósito de analizar las regiones del gen que están involucradas en

*Our work tries to elucidate the function of some proteins secreted by the mammalian genital tracts, or present in the plasmatic membrane of the gametes, which could have important roles in the reproductive process. Three different types of protein are studied: **A)** Phospholipase A2 (PLA2) which is an enzyme related to lipid metabolism and to the exocytotic cellular mechanisms. PLA2 is analysed in regards to its probable role during acrosome reaction, as well as during the membrane recognition phenomena which occur during fertilization. **B)** Some proteins secreted by the rat seminal vesicles (particularly those of 45 and 18.5 kDa) are analysed in order to know the probable function/s that they would have on the prefertilizing spermatozoa and/or on the gamete transport in the female tract. **C)** Uteroglobin (UTG), a protein secreted by the rabbit genital tract, is also analysed. Using transgenic mice for different UTG gene regions, the*

la unión de receptores para hormonas esteroidicas, y la expresión específica de tejido. Asimismo, utilizando estos animales, se pretende conocer más exactamente la participación de esta proteína en los cambios que ocurren en el espermatozoide y oocito, antes y durante la fecundación, así como en el embrión temprano. □

specific tissue expression and the different gene regions involved in recognizing steroid hormone receptors are determined. Moreover, with the use of transgenic mice, we try to determine some roles of UTG during fertilization and/or early embryogenesis. □

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- DGICYT, PB02-3602 (1988-1991)
- DGICYT, PM90-0068 (1991-1994)

Publicaciones

Publications

- Carballada, R., and Esponda, P.: Electrophoretical pattern of rodent seminal vesicle proteins as revealed by a silver staining procedure. *Int. J. Androl.* 14, 52-57, 1991.
- Esponda, P., and Guerra, R.: Plasma membrane glycoproteins during spermiogenesis and in spermatozoa of some Orthoptera. *Cell Tissue Res.* 264, 507-513, 1991.
- Esponda, P.: Spermatozoon maturation in vertebrates with internal fertilization. *Micr. Electr. Biol. Cel.* 15: 1-24, 1991.
- Gómez Lahoz, E., López de Haro, M.S., Nieto, A., and Esponda, P.: Use of puromycin N-Acetyltransferase (PAC) as a new reporter gene in transgenic animals. *Nucleic Acid Res.* 19, 3465, 1991.
- Esponda, P., Gómez Lahoz, E., and Riffo, M.: Phospholipase A2 in hamster spermatozoa: Localization and participation in the acrosome reaction. In: *"Comparative Spermatology Twenty Years After"* (Ed.) B. Baccetti. Raven Press. N.Y. pp 161-164, 1991.
- Riffo, M., Gómez-Lahoz, E., and Esponda, P.: Immunocytochemical localization of Phospholipase A2 in hamster spermatozoa. *Histochemistry* 97, 25-31, 1992.
- Carballada, R., and Esponda, P.: Role of fluid from seminal vesicles and coagulating glands in uterine sperm transport and fertility in rats. *J. Reprod. Fertil.* 95, 639-648, 1992.
- Esponda, P., and Carballada, R.: Interaction between seminal vesicle fluid proteins and the spermatozoon plasma membrane in some rodents. In: *"Proc. XII Congress on Animal Reproduction"* (Ed.) S.J. Dieleman. Elsevier. Amsterdam. pp 436-440, 1992.
- Gómez Lahoz, E., López de Haro, MS., Esponda, P., and Nieto, A.: Tissue-specific and hormonally regulated expression of the puromycin N-acetyltransferase-encoding gene under the control of the rabbit uteroglobin promoter in transgenic mice. *Gene* 117, 255-258, 1992.
- Carballada, R., and Esponda, P.: Structure of the vaginal plugs generated by normal rats and by rats with partially removed seminal vesicles. *J. Exp. Zool.* 265, 61-62, 1992.

Análisis Molecular de la Meiosis

Molecular Analysis of Meiosis

Jesús del Mazo	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico <i>Tenured Scientist</i>
Miguel Torres (Hasta VII-1992)		Postdoctoral <i>Postdoctoral Fellow</i>
Dulce M. López Alañón Luis A. López Fernández		Predoctorales <i>Graduate Students</i>
Cristina Templado		Investigadora Asociada <i>Associate Scientist</i>
Ana M. Gutierrez (Hasta V-1991)		Personal Técnico <i>Technical Staff</i>



Análisis molecular de la meiosis

Molecular analysis of meiosis

En Eucariontes, la meiosis es un proceso genéticamente controlado, evolutivamente conservado e imbricado en la gametogénesis. El trabajo en nuestro laboratorio está centrado en el análisis de las bases moleculares que regulan este proceso. El desarrollo diferencial de la gametogénesis en mamíferos nos ofrece un sistema para aislar genes meióticos y caracterizar mecanismos moleculares implicados en el proceso. Para este objetivo, hemos construido genotecas de cDNA a partir de ovarios fetales en estadios específicos del desarrollo. Hemos aislado clones inicialmente correspondientes a transcritos meiótico específicos y se está secuenciando y caracterizando el patrón de expresión de un grupo de estos mRNA de función desconocida hasta hoy. En este contexto, con el fin de aislar genes implicados en señales de inicio meiótico también hemos creado genotecas de sustracción

In Eukaryotes, meiosis is a process genetically controlled, conserved and overlapped with gametogenesis. Work in our laboratory is focused on the analysis of the molecular basis that regulate this process. The particular development of mammalian gametogenesis provides a system to isolate meiotic genes and characterize molecular mechanisms involved in the process. To this end, we have constructed cDNA libraries from fetal mouse ovaries at specific stages of development. We have isolated clones corresponding to meiotic transcripts and we are currently sequencing and characterizing the expression pattern of a group of mRNAs with unknown functions. Also in this context, we are creating subtractive cDNA libraries from newborns and 7-day mouse testis, to isolate genes involved in

de cDNA a partir de testículos de ratón neonato y de 7 días. Asimismo, se está analizando la expresión génica durante la gametogénesis, de algunos genes conocidos (incluyendo algunos oncogenes) potencialmente implicados en estos procesos.

Se están examinando también los mecanismos que generan durante la meiosis y la gametogénesis el *imprinting* genómico parental. Se están trazando los patrones de metilación en regiones específicas del genoma de genes sometidos a *imprinting*, mediante PCR, después de digestión del DNA con isoesquizómeros de nucleasas metil-dependientes. Para este propósito, estamos analizando células gaméticas en estadios específicos, en los dos sexos y en los productos de fecundación *in vitro* entre ratones *Mus musculus* y *Mus spretus*. □

the signals of meiosis initiation. Gene expression during gametogenesis of some known genes (including some oncogenes) potentially involved in these processes, is also being analyzed.

*We are also looking at the mechanisms for generate genomic parental imprinting during meiosis and gametogenesis. Using PCR after DNA digestion with methylation-depending isoschizomer nucleases, we are tracing the methylation pattern in specific genomic regions of genes under imprinting (H 19). To this aim, we are analyzing gamete cells at specific stages, in both sexes and in the product of in vitro fertilization between *Mus musculus* and *Mus spretus* mice. □*

Organismos Financiadores Funding Agencies

- DGICYT, PB89-0053
- CAM, C077/91
- Programa bilateral CSIC-CNR (Italia)

Publicaciones Publications

Gil-Alberdi, L. y del Mazo, J.: Microtubule-associated proteins during mouse spermatogenesis. Localization of a protein immunologically related to brain MAP1B protein in the synaptonemal complex. *Cytogenet. Cell Genet.* 59: 1-5, 1992.

Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados

Growth Factors in Vertebrate Development

Flora de Pablo	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico <i>Tenured Scientist</i>
Enrique J. de la Rosa		Investigador Contratado <i>Tenure-track Scientist</i>
Beatriz Pérez-Villamil Pilar R.Gonzalez-Guerrero		Postdoctorales <i>Postdoctoral Fellows</i>
Ana López Carranza		Predoctoral <i>Graduate Student</i>
José Serna		Pregraduado <i>Undergraduate Student</i>
Elena Martínez		Personal Técnico <i>Technical Staff</i>



Expresión de factores de la familia de la insulina, regulación de sus receptores y acción en la embriogénesis.

Expression of insulin and insulin-like growth factors, regulation of their receptors and action in embryogenesis.

Nuestro Laboratorio se creó en julio de 1991 con la incorporación al CIB de la Dra. de Pablo. Los restantes miembros han comenzado sucesivamente su trabajo en el laboratorio a lo largo del periodo, hasta configurarse el grupo actual en junio de 1992.

El objetivo general de nuestro proyecto es el estudio del papel de los factores de crecimiento (en sentido amplio, incluyendo hormonas y otras citocinas) en el desarrollo embrionario de los vertebrados. En los últimos años hemos centrado nuestro trabajo en los factores de la familia de la insulina, los IGFs y la propia insulina, y en sus receptores tipo tirosina-quinasa. Utilizando como modelos el embrión de pollo y el anfibio *Xenopus*, hemos demostrado que la insulina se expresa en el embrión antes de la diferen-

Our Laboratory was created in July of 1991, after the arrival of Dr. de Pablo to the CIB. The other members have been progressively recruited during the following year, and the group was formed in its present configuration in June of 1992.

*The general aim of our project is to study the role of growth factors (in a broad sense, including hormones and other cytokines) in vertebrate embryonic development. In recent years, our work was focused on the polypeptides of the insulin family, IGFs and insulin itself, and their tyrosine kinase receptors. Using the chick embryo and the amphibian *Xenopus* as models, we demonstrated that insulin is expressed in the embryo before there is a differentiated*

ciación del páncreas. Se han clonado cDNAs correspondientes a las regiones tirosina-quinasa del receptor de insulina y del receptor de IGF-I en ambas especies y, mediante técnicas de amplificación (RT-PCR), hemos comprobado que estos receptores están expresados desde las primeras fases de la embriogénesis. El análisis de un modelo de retraso de crecimiento ha puesto de manifiesto el posible papel endocrino del IGF-I en el crecimiento prenatal. El papel paracrino de este factor, específicamente sus efectos en la diferenciación celular y la expresión de genes, se ha estudiado en el cristalino, órgano avascular de organogénesis temprana. En este tejido el IGF-I y, en menor grado, la insulina estimulan la transcripción del gen de la cristalina- δ . En experimentos de transfección transitoria se ha encontrado que la acción del IGF-I requiere elementos *cis* en el promotor de la cristalina- δ 1, que incluyen un lugar de unión del factor de transcripción Sp-1.

En la actualidad estamos profundizando en distintos aspectos del proyecto a nivel celular y molecular. Hemos iniciado una caracterización detallada de los elementos del sistema, los péptidos (insulina e IGF-I), sus receptores y las proteínas de unión de IGF, durante la neurulación y desarrollo temprano del ojo (retina principalmente). Estamos especialmente interesados en la regulación de la expresión de los distintos elementos, sus interacciones con otros factores tisulares y la caracterización de mecanismos de acción diferencial en cuanto a efectos sobre la proliferación y diferenciación celular, incluyendo la expresión de genes específicos de tejido. □

pancreas. We cloned cDNAs corresponding to the tyrosine kinase regions of the insulin and IGF-I receptors in both species and, applying amplification techniques (RT-PCR), we have shown that these receptors are expressed from very early embryogenesis. The study of a model of growth retardation, has suggested a possible endocrine role of IGF-I in prenatal growth. The paracrine role of this factor, specifically its effects on differentiation and gene expression, were studied in the eye lens, an avascular organ developed early in organogenesis. In this tissue IGF-I, and less well insulin, stimulate transcription of the δ -crystallin gene. In transient transfection experiments, IGF-I action requires cis-acting elements of the δ -1 crystallin promoter, that include a binding site for the transcription factor Sp-1.

Our current interest is to continue the different aspects of the project in depth at the cellular and molecular level. We have recently initiated a detailed characterization of the elements of the system, the peptides (insulin and IGF-I), their receptors and the IGF binding proteins, during neurulation and early eye development (retina specially). We are particularly interested in understanding the regulation of expression of these elements, their interactions with other tissue factors, and the characterization of differential mechanisms of action related to their effects on cellular proliferation and differentiation, including tissue-specific gene expression. □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- FISs, 91/0218 (1991-1994)
- Acción Especial Programa Científico del CSIC (1991-1992)
- DGICYT, PB92-0017 (1992-1995)

Publicaciones Publications

- Scavo, L., Shuldiner, A.R., Serrano, J., Dashner, R., Roth, J. and De Pablo, F.: Receptor genes for insulin and insulin-like growth factor I are differentially expressed in *Xenopus* oocytes and embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6214-6218, 1991.
- Alemany, J., Peralta-Soler, A., Smith, R., Roth, J., Jarrett, L. and De Pablo, F.: Embryonic chicken lens cultured in reconstituted basement membrane: an experimental model to maintain the epithelial phenotype in culture. *Growth Reg.* 1: 62-64, 1991.
- Robcis, H.L., Caldés, T. and De Pablo, F.: Insulin-like growth factor I serum levels show a mid-embryogenesis peak in chicken that is absent in growth retarded embryos. *Endocrinology* 128: 1895-1901, 1991.
- Scavo, L.M., Serrano, J., Roth, J. and De Pablo, F.: Insulin receptor and insulin-like growth factor I receptor genes are expressed in the chicken embryo blastoderm and throughout organogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 176: 1393-1401, 1991.
- Shuldiner, A.R., De Pablo, F., Moore, C.A. and Roth, J.: Two nonallelic insulin genes in *Xenopus laevis* are expressed differentially during neurulation in prepancreatic embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7679-7683, 1991.
- Caldés, T., Alemany, J., Robcis, H.L. and De Pablo, F.: Expression of insulin-like growth factor I in developing lens is compartmentalized. *J. Biol. Chem.* 266: 20786-20790, 1991.
- Keyyem J. F., Roman J. M., De la Rosa E. J., Schwarz U. and Dreyer W. J.: Bravo/Nr-CAM is closely related to the cell adhesion molecules L1 and Ng-CAM and has a similar heterodimer structure. *J. Cell Biol.* 118:1259-1270, 1992.
- Fairén A., Smith-Fernández A., Martí E., De Diego I. and De la Rosa E. J.: A transient immunoglobulin-like reactivity in the developing cerebral cortex of rodents. *Neuroreports* 3: 881-884, 1992.
- Girbau, M., Gonzalez Guerrero, P.R., Bassas, L. and De Pablo, F.: Insulin receptors and insulin-like growth factor I receptors in embryos from gastrula until organogenesis. *Mol. Cell. Endocrin.* 90: 69-75, 1992.
- Alemany, J., Klement, J., Borrás, T. and De Pablo, F.: DNA binding factors which interact with the Sp1 site of the chicken δ -crystallin promoter are developmentally regulated. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183: 659-665, 1992.

Biología Molecular de los Cromosomas Eucarióticos

Molecular Biology of Eukaryotic Chromosomes

Jorge Bernardo Schwartzman	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientists
Dora Beatriz Krímer Smunís Pablo Hernández Valenzuela		
Vianney Castañeda Carlos López Estraña Luis Martín-Parras		Predoctorales Graduate Students
María Luisa Martínez Robles		Personal Técnico Technical Staff



En nuestro grupo se han desarrollado tres líneas principales de investigación: **a)** Estudio y caracterización de orígenes funcionales y términos de replicación en formas monoméricas y multiméricas de plásmidos del tipo ColE1; **b)** Análisis estructural y funcional de la replicación de los genes ribosómicos (rDNA) en organismos superiores; y **c)** Identificación y clonaje de genes involucrados en la diferenciación celular en células MEL ("Murine erythro-leukemia"). En el primer caso, hemos utilizado la electroforesis bidimensional en geles de agarosa para estudiar los intermediarios de replicación (RIs) de plásmidos del tipo ColE1 en *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos demuestran que la iniciación de la replicación ocurre en un sólo origen, independientemente del número de orígenes potenciales presentes. En el segundo caso, hemos secuenciado parte del espaciador no-transcrito (NTS) del rDNA de *Pisum sativum*, en donde tiene lugar la iniciación de la replicación. El análisis

Three different research lines have been developed in our group: a) Analysis and characterization of functional replication origins and termini in monomeric and multimeric forms of ColE1 plasmids; b) Structural and functional analysis of the replication of ribosomal genes (rDNA) in higher eukaryotes; and c) Identification and cloning of genes involved in cell differentiation in MEL (Murine erythro-leukemia) cells. In the first case, we used two-dimensional (2D) agarose gel electrophoresis to analyze the replicative intermediates (RIs) of ColE1 plasmids in Escherichia coli. The results obtained showed that initiation of DNA replication occurs at a single site irrespective of the number of potential origins present per plasmid. In the second case, we sequenced a fragment of the non-transcribed spacer (NTS) of Pisum sativum rDNA where initiation of DNA replication takes place. Analysis of the RIs by 2D

de los IsR nos ha permitido identificar y mapear una barrera a la progresión de las horquillas situada en el NTS adyacente al extremo 3' del transcrito primario. En el tercer caso, hemos utilizado técnicas de hibridación diferencial con sondas complejas de cDNA sintetizadas a partir de mRNAs aislados de células indiferenciadas y en los primeros estadios de la diferenciación. Estas sondas fueron utilizadas para barrer una librería de cDNA construída a partir de células MEL inducidas con HMBA. Se han identificado así una serie de genes que se expresan diferencialmente entre los que se encuentra el que codifica para la histona variante H3.3B. □

gels led us to identify a polar replication fork barrier (RFB), which was mapped in the NTS close to the 3' end of the primary transcript. In the third case, differential hybridization with complex cDNA probes synthesized with mRNAs isolated from undifferentiated cells and cells committed to differentiate, was used to screen a cDNA library made from MEL cells that were induced to differentiate with HMBA. We identified several genes whose expression changes during cell differentiation. Among these genes we characterized one which codes for the histone variant H3.3B. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

-DGICYT, PB87-0468 (1988-1992)

Publicaciones
Publications

- Martín-Parras, L., Hernández, P., Martínez-Robles, M.L. and Schwartzman, J.B.: Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 220, 843-853, 1991.
- Martín-Parras, L., Hernández, P., Martínez-Robles, M.L. and Schwartzman, J.B.: Initiation of DNA replication in Co1E1 plasmids containing multiples potential origins of replication. *J. Biol. Chem.*, 267, 22469-22505, 1992.

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

Lucas Sánchez Rodríguez	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientists
Eduardo Torroja Cavanillas	(1991)	
Begoña Granadino Goenechea		Postdoctoral Postdoctoral Fellow
Paulo Roberto da Cunha	(1992)	
Luiz Otavio Ferraz Penaiva	(1992)	Predoctorales Graduate Students
Miguel Torres Sánchez	(1991)	
Eva Cristóbal Lana	(1992)	
Carmen Doñoro Vázquez	(1992)	Pregraduados Undergraduate Students
María Fernanda Ruiz Lozano	(1992)	
Luis Vicente Hernández		Investigador Asociado Associate Scientist
Rosario de Andrés Montes		
Dolores Mateos Moya		Personal Técnico Technical Staff



Nuestro proyecto se centra en el análisis de la regulación de la actividad génica durante el proceso ontogenético. Para ello usamos como modelo los procesos de la determinación sexual y de la compensación de dosis génica en *Drosophila melanogaster*. El análisis se lleva a cabo mediante el aislamiento y posterior caracterización genético-molecular de mutantes que tienen afectados dichos procesos. Además, hemos iniciado el aislamiento y posterior caracterización en otras especies de *Drosophila*, así como en otros Insectos, de los genes homólogos de *Drosophila melanogaster* implicados en la determinación sexual. Se ha identificado un gen del cromosoma X requerido para la activación del gen *Sex-*

*The group is interested in the understanding of the genetic, and ultimately molecular, basis governing ontogenetic processes. For this purpose, it is using as an experimental model the processes of sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. We isolate mutations affecting these two processes and we carry out their genetic and molecular characterization. Furthermore, we have initiated the isolation, in other species of *Drosophila* and in other Insects, of the genes homologous of those controlling sex determination in *Drosophila melanogaster*. We have found that the segmentation gene *runt* is needed for*

Compensación de dosis génica y determinación sexual en *Drosophila melanogaster*

Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*

lethal. Se trata del gen *runt*, el cual está también implicado en el proceso de segmentación. Se ha determinado que la señal X:A controla la activación inicial de *Sxl* a nivel de transcripción. Se han identificado dos regiones del cromosoma X necesarias para la activación inicial de *Sxl*. Estas regiones están definidas por las deficiencias *Df(1)N19* y *Df(1)RA2*. Se ha llevado a cabo el análisis del gen *fl(2)d* en el desarrollo de la línea germinal, encontrándose que dicho gen se necesita para el desarrollo de la línea germinal de las hembras, pero no para la de los machos. Se ha aislado una nueva mutación en el gen *fl(2)d* por inserción del elemento transponible P. La posterior movilización de dicho elemento de la citada mutación nos ha permitido aislar 80 cromosomas que presentan nuevas mutaciones en el gen *fl(2)d*, así como reversiones. Actualmente estamos llevando a cabo el patrón de complementación de dichas mutaciones. Hemos aislado clones genómicos de una genoteca de *Drosophila subobscura* homólogos de los genes *Sex-lethal*, *transformer* y *scute*, que actualmente estamos caracterizando. □

the activation of Sex-lethal in females. We have determined that the control of Sex-lethal by the X:A signal takes place at the transcription level. We have identified two further regions in the X chromosome required for the initial activation of Sex-lethal. These two regions are defined by the deficiencies Df(1)N19 and Df(1)RA2. The analysis of the gene fl(2)d in the development of the germline revealed that this gene is necessary for the development of the female germline, while has no effect on the development of the male germline. We have obtained a P-induced fl(2)d mutation, named as fl(2)d^P. The mobilization of the P element from this mutation rendered the generation of 80 chromosomes with new fl(2)d mutations and revertants. At present, we are carrying out the complementation pattern of these new mutations. We have isolated positive genomic clones from Drosophila subobscura homologous of the genes Sex-lethal, scute and transformer of Drosophila melanogaster, that we are analyzing. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- DGICYT, PB87-0239 (1988-1993)

Publicaciones

Publications

- Bachiller, D. and Sánchez, L.: Production of XO clones in XX females of *Drosophila*. *Genet. Res.*, 57: 23-28, 1991.
- Granadino, B., San Juan, A. B. and Sánchez, L.: The gene *fl(2)d* is required for various *Sxl*-controlled processes in *Drosophila* females. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 200: 172-176, 1991.
- Granadino, B., Torres, M., Bachiller, D., Torroja, E., Barbero, J. L. and Sánchez, L.: Genetic and molecular analysis of new female-specific lethal mutations at the gene *Sex-lethal* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 129: 371-383, 1991.
- Torres, M. and Sánchez, L.: The sisterless-b function of the *Drosophila* gene *scute* is restricted to the stage when the X:A ratio determines the activity of *Sex-lethal*. *Development*, 113: 715-722, 1991.
- Granadino, B., San Juan, A. B., Santamaría, P. and Sánchez, L.: Evidence of a dual function in *fl(2)d*, a gene needed for *Sex-lethal* expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 130: 597-612, 1992.
- Sánchez, L. and Granadino, B.: Gradual acquisition of the developmental capacity to differentiate adult structures by the genital disc of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 201: 105-112, 1992.
- Torres, M. and Sánchez, L.: The segmentation gene *runt* is needed to activate *Sex-lethal*, a gene that controls sex determination and dosage compensation in *Drosophila*. *Genet. Res.*, 59: 189-198, 1992.

Genética del Desarrollo en Dípteros *Developmental Genetics in Diptera*

María Isabella Cubells	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Esmeralda Cortés Rubio (Hasta VII-1991)		Postdoctoral Postdoctoral Fellow
Nieves García (Desde X-92) Eduardo Gorab		Predoctorales Graduate Students
Gloria Morcillo Ortega		Investigadora Asociada Associate Scientist
Josefa Fernández-Cabrera Amelia Partearroyo Lacaba		Personal Técnico Technical Staff



Sistemas génicos inducibles por cambios ambientales en células politenizadas de *Chironomus sp.*

Gene systems inducible by environmental changes in polytenic cells of Chironomus sp.

Los cromosomas politénicos de la glándula salival de *Chironomus thummi* (Diptera) se han usado como modelo de estructura génica, expresión y regulación frente a cambios ambientales: los problemas abordados son:

1. Transcripción de secuencias asociadas al telómero, y su inducibilidad tras choque térmico. En *Chironomus* se detectan transcritos teloméricos de unas 20 kb. En *Chironomus thummi*, se induce un *puff* telomérico tras choque térmico. La transcripción de secuencias asociadas a este telómero aumenta por elevación de la temperatura de cultivo. Se detecta la presencia del transcrito en el citoplasma, y en tejidos no politénicos de la larva.

2. Los anillos de Balbiani o BRs. Representan los *loci* más activos en la glándula salival durante todo el desarrollo lar-

Polytene chromosomes in the salivary gland of Chironomus thummi (Diptera) have been used as a model system to study structure, expression and regulation of genes in organisms subjected to environmental changes. The problems approached are:

1. *Transcription of telomeric associated sequences, and their heat-shock inducibility. Telomeric transcripts around 20 kb are detected in Chironomus sp. In C. thummi a telomeric puff is induced by heat-shock. The transcript associated to the induction is found in the cytoplasm as well as in non-polytenized tissues.*

2. *Balbani rings or BRs are the most active loci in salivary glands during the larval development of Chironomus sp. Galactose added to the culture medium induces changes in the*

vario de *Chironomus*. Con galactosa se pueden inducir cambios específicos en su expresión citológica, mRNAs y proteínas. Se ha caracterizado el sistema BR/proteínas de secreción salival (familia sp-1, de 10°D) en *Chironomus thummi*. Asimismo, se han detectado 2 proteínas nucleares, posiblemente implicadas en la red de regulación coordinada de los BRs, una de ellas con probable mecanismo de regulación postranscripcional *feed-back*, y la otra podría ser un factor de transcripción correlacionado con la inducción de uno de los BR.

3. Presencia de BR6 en *C. thummi*. Este BR es inducible por galactosa en *Camptochironomus* sp., no descrito en *Chironomus thummi*. Tratamos clonar, caracterizar y secuenciar DNA homólogo a BR6 para comparaciones evolutivas entre *C. thummi* y *Camptochironomus* sp.

4. Estudio de la transcripción de secuencias ClaI, medianamente repetitivas, interespersas en el genoma de *C. thummi*, especialmente enriquecidas en centrómeros y nucleolo. Se han detectado transcritos de ambos orígenes.

5. Recientemente se ha iniciado la búsqueda y clonación en *C. thummi* de genes implicados en desarrollo del sistema nervioso central y en determinación sexual por homología a sondas de *Drosophila melanogaster*. El grupo colabora con el laboratorio del Dr. Lucas Sánchez en la clonación del gen *fl(2)d* implicado en la determinación sexual en *Drosophila melanogaster*. □

pattern of expression at cytological and biochemical levels (in RNA and proteins). The system BRs/secretory proteins encoded by them has been characterized in C. thummi (sp-1 family, 10°D). Moreover, two nuclear proteins were detected, possibly involved in the network of coordinated regulation within BRs; one of them with a putative posttranscriptional feed-back mechanism. The other is likely to be a transcription factor, correlated with the induction of one member of B.R. family.

3. BR6 detection in C. thummi. This BR is inducible in Camptochironomus sp. but, so far, it has not been found in C. thummi. We try to clone, characterize and sequence BR6-homologous DNA in the latter species for evolutive comparisons between C. thummi and Camptochironomus sp.

4. Study of the transcription of middle repetitive sequences, Cla I, interspersed in C. thummi genome. These sequences are especially enriched in centromers, and the nucleolar organizer. Transcripts coming from both origins have been detected.

5. Search and screening of homologous genes to Drosophila involved in central nervous system development and sex determination. The group has a collaboration with the Dr. L. Sánchez laboratory in the cloning of fl(2)d, involved in sex determination in Drosophila. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

-DGICYT PB90-1026 (1992)

Publicaciones
Publications

- Botella, L.M., Cortés, E., Gorab, E., and Díez, J.L.: The occurrence of BR6 analogous sequences in the midge species *C. thummi*. *Hereditas* 115: 1, 83, 1991.
- Botella, L.M., and Edström, J.E.: The Balbiani Ring 6 induction in *Chironomus*. *Biol. Cell* 71, 11-16, 1991. Dedicated to the memory of Daniel Sandoz.
- Botella, L.M., Morcillo, G., Baretino, D., and Díez, J.L.: Heat-shock induction and Cytoplasmic Localization of Transcripts from Telomeric-Associated sequences transcription in *Chironomus thummi*. *Exp. Cell Res.* 196, 206-209, 1991.
- Silva, F.J., Bel, Y., Botella, L.M., Cotton, G.M. and Ferré, J.: Immunological detection of phenylalanine hydroxylase protein in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 287, 85-89, 1992.
- Botella, L.M. Cortés, E., and Díez, J.L.: Induction of nuclear protein synthesis associated to Balbiani Ring changes of expression. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22, 471-479, 1992.

Biología Celular y del Desarrollo de Nematodos

Cellular and Developmental Biology of Nematodes

Clara Goday Baylina	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Giovanna Giovinazzo Rosario Esteban Fernández		Predctorales Graduate Students
Mercedes Jiménez Sarmiento		Personal Técnico Technical Staff



Estamos usando el nematodo *Parascaris* como modelo para estudiar aspectos estructurales y funcionales del cromosoma eucariótico. En particular, hemos analizado la organización del centrómero y su papel en el proceso de disminución de cromatina. Este proceso, que ocurre en embriones tempranos durante la separación de la línea germinal y somática, consiste en la fragmentación cromosómica y eliminación del material heterocromático (DNA satélite representando un 80% del genoma) en todas las células presomáticas. Tras desarrollar una técnica que permite permeabilizar las envolturas del embrión, hemos estudiado las divisiones celulares durante la embriogénesis temprana mediante inmunocitoquímica y microscopía electrónica. Tras analizar las interacciones cromosoma/huso y la estructura del cinetocoro en células presomáticas y somáticas de embriones hemos podido demostrar que durante la disminución de cromatina el material heterocromático es eliminado de los cromosomas de las células presomáticas debido a la inactivación de su centrómero. Además, hemos obtenido información nueva sobre las interacciones iniciales microtúbulos/cromosomas durante la formación del primer huso

We are using the nematode Parascaris as a model to study structural and functional aspects of eucariotic chromosomes. In particular, we have analyzed the organization of the centromere and its role in the process of chromatin diminution. This process occurs in all presomatic cells of early embryos during germ line and soma differentiation and consists of chromosome fragmentation and elimination of the heterochromatic material (satellite DNA that represents 80% of the genome). After developing a technique to separate the egg shell from the embryos, we studied cell divisions during early embryogenesis by immunochemical and EM approaches. We analyzed chromosome/spindle interactions and kinetochore structure in presomatic and somatic cells in early embryos and we have demonstrated that during chromatin diminution, the heterochromatic material is discarded from the chromosomes of presomatic cells by inactivation of its centromeric functions. In addition we have also obtained new information about the initial microtubules/chromosomes interactions during the first cell division in Parascaris

mitótico-embriónal. Completada la caracterización estructural de los diferentes estados de centrómero presentes en los distintos tipos celulares de *Parascaris*, nos hemos centrado en la búsqueda y disección de proteínas cromosómicas importantes, estructuralmente y/o funcionalmente, para la función centromérica. Hemos identificado en *Parascaris* polipéptidos similares a proteínas asociadas al centrómero en mamíferos, que actualmente estamos caracterizando.

Para conocer más sobre el significado biológico del proceso de la disminución de cromatina en relación a la separación temprana de las líneas somática y germinal en estos nematodos, hemos analizado los efectos de sustancias vegetalizantes y animalizantes en embriones tempranos de *Parascaris*. Hemos conseguido modificar el patrón de eliminación en las primeras divisiones y los datos obtenidos nos han permitido concluir que la disminución de cromatina y la calidad somática de los blastómeros son fenómenos estrictamente relacionados e inseparables. Actualmente estamos explorando el papel de las primeras divisiones embrionales asimétricas en relación a la ocurrencia de la disminución de cromatina.

Recientemente, hemos comenzado a explorar la composición bioquímica de los centrosomas habiendo identificado en *Parascaris* y *C. elegans* antígenos de alto peso molecular comunes a centrosomas de mamíferos y *Drosophila*. Usando anticuerpos específicos para centrosomas de *Drosophila* (BX63, Rb188) hemos demostrado que dichos antígenos conservados están también presentes en estructuras asociadas al huso que intervienen en la formación del surco de segmentación en embriones de *Parascaris* durante la citocinesis. □

embryos. We have now achieved a complete structural characterization of the different centromere states that are present in different Parascaris cell types. Our attention was also focused in the search and dissection of Parascaris chromosome proteins, structurally and/or functionally important for centromeric function. We have identified in Parascaris similar polypeptides to centromere-associated proteins of mammals that we are presently analyzing.

To further investigate the biological significance of the process of chromatin diminution in relation to the early separation of somatic line in these nematodes, we have studied the effects of vegetalizing and animalizing substances on early Parascaris embryos. We have been able to change the diminution pattern of early divisions and the obtained data lead us to conclude that chromatin diminution and somatic quality of blastomeres are strictly related phenomena that are not separable. We are now exploring the role of the first asymmetrical early divisions in relation to chromatin diminution occurrence.

Recently, we became also interested in exploring the biochemical nature of centrosomes and we have identified in Parascaris and C. elegans high molecular weight antigens common to mammals and Drosophila. Using antibodies specific for Drosophila centrosomes (BX63, Rb188) we have shown that these conserved antigens are also present in spindle-associated structures involved in the formation of the furrow cleavage in Parascaris embryos during cytokinesis. □

Científicos Invitados
Invited Scientists

- Dra. Silvia Bonaccorsi. Centro di Genetica Evoluzionistica. CNR. Roma. Italia. EMBO short-term.

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- DGICYT, PB 90-0073, (1991-1994).
- Cooperación entre España e Italia, CSIC/CNR, (1990-1992).
- Cooperación España - República Popular China, CSIC - University of Fudan, (1991-1992).

Publicaciones
Publications

- Goday, C., González-García, J.M., Esteban, M.R., Giovinzazo, G., and Pimpinelli, S. Kinetochores and chromatin diminution in early embryos of *Parascaris univalens*. *J. Cell Biol.* 116, 23-32, 1992.

Reproducción Celular

Cell Proliferation

José Luis Cánovas	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Gonzalo Giménez Martín Consuelo de la Torre Aurora González Fernández		
M^a Inmaculada Giménez		Postdoctoral Postdoctoral Fellow
Leticia Borboa de Cuestos Juan F. Giménez Abián		Predoctorales Graduate Students
Margarita Carrascosa José Luis Marcilla		Personal Técnico Technical Staff



Se investiga el papel en *cis* que ciertas secuencias del DNA, distinguibles por sus tiempos de replicación, juegan en la progresión de las células meristemáticas por las fases de su ciclo de proliferación. Así, se ha podido determinar cómo las secuencias cuya presencia intranuclear es un requisito para el encendido de la replicación en un núcleo, así como las requeridas para la iniciación de la condensación de la cromatina, se encuentran distribuidas en sólo unos pocos de los ocho cromosomas del complemento haploide de *Allium cepa* L. Manipulando la capacidad del DNA de interaccionar con proteínas mediante bromosustitución (seguida de irradiación anóxica a 313 nm) y, alternativamente, mediante incorporación de 5-azacitidina se está haciendo la disección de las regiones del DNA que están implicadas tanto en la regulación positiva como en la negativa de las transiciones del ci-

The cis-acting role of DNA sequences in cycle progression is studied in Allium cepa L. meristematic cells. The sequences are distinguished by their different replication times. Their role is studied in the G₁ to S and G₂ to M transitions. In this way, it has been possible to determine that the sequences which are needed within a nucleus to trigger replication or to initiate mitotic chromosome condensation are distributed in only few of the eight chromosomes of the haploid complement of this species. Regions of DNA involved both in the positive and negative regulation of the main cycle transitions are being dissected by altering the DNA capability to interact with the normal set of regulatory DNA-binding proteins. Such DNA binding capability is being modified either by bromosubstitution, followed by anoxic irradiation at 313 nm wavelength, or by 5-azacytidine in-

clo celular. Se complementa dicho estudio con la determinación del momento del ciclo en que la inhibición de la traducción de nuevas proteínas produce efectos análogos a los producidos por las modificaciones en los distintos segmentos del DNA. Estos conocimientos sobre regulación del ciclo en estas células están siendo aplicadas al desarrollo de un protocolo optimizado que permita de forma sensible y específica la detección de agentes genotóxicos en plantas.

corporation. The study is complemented by determining the time in the cycle where the inhibition of translation of new proteins produces effects analogous to those produced by the modification of the canonical bases of DNA.

The knowledge the group possesses about regulatory steps in the cycle of these cells is being used to optimize a protocol for genotoxicity assessment in plants.

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- CICYT SAL 91-0697 (1991-1994)
- Fundación Ramón Areces (1990-1993)
- CSIC/Universidad de Chile (1990-1992)

Publicaciones

Publications

- Utrilla, L., and De la Torre, C.: Loss of microtubular orientation and impaired development of prophase bands upon inhibition of RNA synthesis in root meristem cells. *Plant Cell Rep.* 9, 492-495, 1991.
- Sans, J., Mergudich, D., Galanti, N., and De la Torre, C.: Cis-acting loci involved in the induction and reversal of chromosome condensation in plant prophase, determined by their different replication times. *Protoplasma* 165, 150-164, 1991.
- De la Torre, C., Giménez-Ablán, J.A. and González-Fernández, A.: Dominance of a NOR (nucleolar organizer region) over its allele and over its sister NOR after asymmetric 5-azacytidine substitution of plant chromosomes. *J. Cell Sci.* 100, 667-674, 1991.
- De la Torre, C., González-Fernández, A., Giménez-Ablán, M.I., and Giménez-Martin, G.: Regulation of cycle progression in plant cells. *Glom. Bot. Ital.* 125, 932-938, 1991.
- Grenet, J., Sans, J., and De la Torre, C.: Effect of caffeine and isobutyl-methyl-xanthine on production of binucleate cells and on post-replicative repair. *Cytobios* 69, 35-39, 1992.
- Mergudich, D., Leyton, C., González-Fernández, A., Sans, J., and De la Torre, C.: Determination of the replication time of nucleolar organizer DNA after 5-azacytidine treatment for restricted parts of the S period. *Protoplasma* 167, 43-49, 1992.

(Continuación de la publicación)
(Continuation of the article)

- Muñoz, F., De la Torre, C., Gracia, F., and García-Herdugo, G.: Condensation of chromatin in the interphase of meristematic cells depends on labile proteins. *Cytobios* 71, 141-149, 1992.
- González-Abián, M.I., De la Torre, C., and López-Sáez, J.F.: Selective hypoxic depression of late replication in meristematic cells of *Allium cepa*. *Protoplasma* 168, 1-6, 1992.
- González-Fernández, A., Aller, P., Sans, J., and De la Torre, C.: Early and late replicating DNA involved in the G₁ to S transition in *Allium cepa* L. meristematic cells. *Biol. Cell*, 74, 243-247, 1992.
- Giménez-Martín, G., Panzera, F., Cánovas, J.L., De la Torre, C., and López-Sáez, J.F.: A limited number of chromosomes makes a nucleus competent to respond to inducers of replication and mitosis in a plant. *Eur. J. Cell Biol.* 58, 163-171, 1992.
- González-Fernández, A., Sans, J., Aller, P., and De la Torre, C.: The involvement of discrete genome regions in chromosome decondensation and in G₁ timing in *Allium cepa* L. meristematic cells. *J. Cell Sci.* 103, 1047-1051, 1992.

Química de Proteínas

Protein Chemistry

Guillermo Giménez Gallego	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Sagrario Ortega Jiménez		Postdoctoral Postdoctoral Fellow
Isabel Muñoz Willery Antonio Plineda Lucena		Predoctorales Graduate Student
Mercedes Zazo Gufo		Personal Técnico Technical Staff

El grupo centra en este momento su investigación en los factores de crecimiento para fibroblastos (FGFs). La amplia distribución de estos factores de crecimiento en el organismo y su amplio espectro de actividades fisiológicas a cuya descripción ha contribuido nuestro grupo, apuntan a que los FGFs desempeñan un papel fisiológico muy relevante en el organismo y que, consecuentemente, podrían estar implicados en numerosos procesos patológicos. Es pues previsible que en un futuro se desarrollen toda una serie de tratamientos terapéuticos basados en la fisiología de los FGFs. El objetivo final del grupo es la ampliación de los conocimientos básicos sobre la fisiología de los FGFs y sobre las bases estructurales de estas propiedades fisiológicas con el objetivo final de que a partir de aquí se puedan desarrollar nuevos productos farmacológicos y nuevos enfoques terapéuticos. Llevamos a cabo nuestras investigaciones en colaboración con el Departamento de Histo-

The wide distribution of the fibroblast growth factors (FGFs) in the organism, and their broad spectrum of physiological activities to whose description our group has contributed, seem to point out to a very relevant role of FGFs in the organism and, consequently, that they could be implied in many pathological processes. On that basis the development of FGFs-based therapeutics seems foreseeable. The final target of the research of our group is to broaden the basic knowledge on the FGFs physiology and molecular basis of those physiological properties, with the final goal that new drugs and therapeutic applications could be developed from that information in the future. This research is carried out in collaboration with the Histology Department of the Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto de Estructura de la Materia (C.S.I.C.), Instituto Ramón

logía del Hospital Universitario Ramón y Cajal, el Instituto de Estructura de la Materia (C.S.I.C.), Instituto Ramón y Cajal (C.S.I.C.), y Unité de Recherches Gérologiques (I.N.S.E.R.M). Actualmente desarrollamos nuestras investigaciones a lo largo de tres líneas:

1. Actividades cardiovasculares de los FGFs
2. Estudios neurológicos de los FGFs
3. Estudios sobre la estructura en solución de los FGFs y de los efectos estructurales de su unión a heparina.

Nuestras aproximaciones experimentales están principalmente basadas en las siguientes técnicas: aislamiento de proteínas, química de proteínas, ingeniería de proteínas, biología molecular, biología celular, experimentos en animales, y técnicas biofísicas como dicroísmo circular, espectroscopía de absorción y fluorescencia, y resonancia magnética nuclear. Es posible que en un futuro próximo podamos incorporar también espectroscopía FTIR y de masas. □

y Cajal, and Unité de Recherches Gérologiques (I.N.S.E.R.M). We are actively involved at this point in time in three main research lines:

1. *Cardiovascular activities of FGFs*
2. *Neurologic effects of FGFs*
3. *Structural studies on FGFs and of their interaction with heparin.*

Our experimental approaches are mainly based in the following techniques: protein isolation, protein chemistry, protein engineering, molecular biology, cell biology, experiments with whole animals, and biophysical techniques as circular dichroism, absorbance and fluorescence spectroscopy, and nuclear magnetic resonance. In the near future is possible that other techniques as FTIR and mass spectroscopy could be also incorporated. □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- DGICYT (1988-1992)
- CAM (1992-1994)

Publicaciones

Publications

- Ortega, S., Schaeffer, M.T., Soderman, D., DiSalvo, J., Linemeyer, D.L., Giménez-Gallego, G., and Thomas, K.A.: Conversion of cysteine to serine residues alters the activity, stability and heparin dependence of acidic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 266, 5842-5846, 1991.
- Ruiz-Echevarría, M.J., Torrontegui, G., Giménez-Gallego, G., and Díaz-Orejás, R.: Structural and functional comparison between the stability system PAR-D of plasmid R1 and CCD of plasmid F. *Mol. Gen. Genet.* 335, 355-362, 1991.
- Cuevas, P., Carceller, P., Ortega, S., Zazo, M., Nieto, I., and Giménez-Gallego, G.: Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science* 254, 1208-1210, 1991.
- Cuevas, P., Giménez-Gallego, G., Martínez Murillo, R., and Carceller, F.: Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in ependymal cells of the rat lateral and third ventricles. *Acta Anatomica* 141, 307-310, 1991.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Taub, D., Wilson, K.E., Giménez-Gallego, G., Rosegay, A., Soderman, A., and Patchett, A.A.: Mechanism-based inactivation of alanine racemase by 3-halovinylglycines. *J. Biol. Chem.* 266, 21657-21665, 1991.
- Thomas, K.A., Ortega, S., Soderman, D., Schaeffer, M.T., DiSalvo, J., Giménez-Gallego, G., Linemeyer, D., Kelly, L., and Menke, J.: Structural modifications of acidic fibroblast growth factor alter activity, stability, and heparin dependence. *Ann. New York Acad. Sci.* 638, 9-18, 1991.
- Seroogy, K.B., Fallon, J.H., Morrison, R.S., Bradshaw, R.A., Giménez-Gallego, G., and Thomas, K.A.: Localization of acidic fibroblast growth factor within the brain. *Growth Factors* 6, 139-157, 1992.
- Zazo, M., Lozano, R.M., Ortega, S., Varela, J., Díaz-Orejás, R., Ramírez, J.M. and Giménez-Gallego, G.: High-level synthesis in *Escherichia coli* of shortened and full-length human acidic fibroblast growth factor and its purification in a form stable in aqueous solutions. *Gene* 113, 231-238, 1992.
- Ortega, S., García, J.L., Zazo, M., Varela, J., Cuevas, P., and Giménez-Gallego, G.: Single-step purification on dodecylsaphacel of recombinant chimeric polypeptides produced in *Escherichia coli*. *Bio/technology* 10, 795-798, 1992.
- Cuevas, P., Carceller, F., Muñoz-Willery, I., and Giménez Gallego, G.: Fibroblast growth factor injected in cerebral ventricles does not decrease mean arterial blood pressure. *NeuroReports* 3, 453-455, 1992.

Estructura e Interacciones de las Proteínas de los Microtúbulos

Structure and Interactions of Microtubule Proteins

José M. Andreu Morales	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientists
Rosario Gli Alvarez		
José F. Díaz Pereira José M. de Pereda Vega		Predoctorales Graduate Students
Almudena Guinea Díaz Susana Serrano Barreno		Investigadores Asociados Associate Scientists
José Morales Alvarez Carmelina Rodríguez Muñoz		Personal Técnico Technical Staff



α -, β -, and γ -tubulina constituyen una superfamilia de proteínas de M_r 50000 que unen GTP. El dímero de $\alpha\beta$ -tubulina ensambla reversiblemente formando los microtúbulos y se convierte en la forma inactiva tubulina-GDP. Los microtúbulos son el blanco de acción de diversas drogas antimitóticas, algunas de las cuales se unen al sitio de la colchicina (J. Biol. Chem. 266, 2890-96, 1991; Biochemistry 31, 11125-32, 1992). γ -tubulina es una proteína centrosomal necesaria para la organización microtubular y la división celular. Nuestras aproximaciones principales para conocer como ensambla la tubulina, y como interacciona la superficie de los microtúbulos con las proteínas asociadas (MAPs) y motores citoplásmicos, que les confieren regulación y funcionalidad, son:

1) **Estructura, función y modificación de la tubulina y MAPs.** Determinación de zonas funcionales de la superficie de tubulina mediante síntesis de

α -, β -, and γ -tubulin are a superfamily of GTP binding proteins of M_r 50000. The $\alpha\beta$ -tubulin dimer reversibly assembles forming microtubules and transforms into its inactive form GDP-tubulin. Microtubules are dynamic structures, main constituents of the spindle and the target of diverse antimitotic drugs, some of which bind to the colchicine site (J. Biol. Chem. 266, 2890-96, 1991; Biochemistry 31, 11125-32, 1992). γ -tubulin is a centrosomal protein essential for microtubule organization and cell division. In order to know how tubulin assembles, and how the microtubule surface interacts with the microtubule associated proteins (MAPs) and cytoplasmic motors which regulate and confer functionality to microtubules, our main goals and experimental approaches are:

1) **Structure, function and modification of tubulin and MAPs.** Determination of functional zones of the tubulin surface, by means of synthetic conser-

secuencias peptídicas conservadas + anticuerpos mono-específicos y monoclonales e inmunológica (J. Mol. Biol. 214, 105-120, 1990), proteólisis diferencial controlada + secuenciación N-terminal, y métodos de predicción de estructura por comparación de múltiples secuencias génicas. Nos proponemos estudiar la inhibición de funciones bioquímicas y celulares de la tubulina por dichos anticuerpos, y la interacción de tubulina con MAPs mediante diseño y síntesis química de módulos de la proteína asociada Tau que inducen el ensamblaje de microtúbulos. Asimismo caracterizaremos el control de la estructura activa/inactiva de la tubulina por el catión coordinado con el fosfato gamma del nucleótido intercambiable, mediante dicroísmo circular, fluorescencia, centrifugación analítica y DSC, e intentaremos obtener dominios y/o cristales de tubulina-GDP susceptibles de determinación estructural a alta resolución.

2) Mecanismo de ensamblaje y estructura de los microtúbulos inducidos por taxol. La polimerización de microtúbulos inducida por esta interesante droga antitumoral, cuya unión hace ensamblar incluso a la tubulina-GDP inactiva (Biochemistry 32, en prensa) constituye un sistema modelo muy simplificado de microtúbulos. Estamos determinando su estructura en solución y mecanismo de formación mediante métodos de rayos X de sincrotrón (J. Mol. Biol. 226, 169-184, 1992), microscopía electrónica, modelado computacional y procedimientos biofísicos convencionales. Estudiaremos también los mecanismos de bloqueo por taxol y de la dinámica y funciones de los microtú-

ved sequences plus monospecific and monoclonal antibodies and immunochemistry (J. Mol. Biol. 214, 105-120, 1990), differential limited proteolysis plus N-terminal sequencing, and structure prediction methods based of multiple sequence comparison. We plan to study the inhibition of biochemical and cellular tubulin functions by these site-directed antibodies, and the interaction with MAPs by means of designing and chemically synthesizing modules of the associated protein Tau which induce microtubule assembly. The control of the active/inactive structure of tubulin by the cation coordinated with the nucleotide gamma phosphate at the exchangeable site will be characterized by circular dichroism, fluorescence, analytical ultracentrifugation and differential scanning calorimetry; the obtention of domains and/or crystals of GDP-tubulin suitable for structural determination at high resolution will be attempted.

2) Mechanism of assembly and structure of taxol-induced microtubules. The polymerization of microtubules induced by this antitumour drug, which can drive the inactive GDP-tubulin to assemble (Biochemistry 32, in press), is a simplified model system of microtubules. The solution structure and assembly mechanism of these microtubules is being determined employing synchrotron X-ray methods (J. Mol. Biol. 226, 169-184, 1992), electron microscopy, computer modelling, and classical biophysical methods. The inhibition by taxol of the microtubule dynamics and functions in epithelial cells, normal human leukocytes and

bulos en células epiteliales, leucocitos humanos normales y líneas leucémicas.

Por otra parte, utilizando protozoos ciliados como modelos de organización de citoesqueleto, se ha estudiado el citoesqueleto de *Frontonia leucas* y *Dicmatostoma colpioides* mediante microscopía electrónica de células tratadas con detergente, observándose continuidad estructural entre las redes microtubulares y microfibrilares de la región oral con las de la corteza somática.

leukemia cell lines will also be studied.

Employing ciliate protozoa as models of cytoskeletal organization, the cytoskeleton of Frontonia leucas and Dicmatostoma colpioides have been examined by electron microscopy of detergent extracted cells. This has revealed structural continuity of the different microfibrillar and microtubular networks in the oral region with those of the somatic cortex.

Científicos Invitados **Visiting Scientists**

- Dr. Vincent Peyrot, de la Universidad de Marsella, Francia.
- Dr. E. Pantos, del SERC Daresbury Laboratory UK.
- Dra. Maria Jerka-Dziadosz, del Nencki Institute of Experimental Biology, Varsovia, Polonia.
- Dra. Isabel S. Novella, de la Universidad de Barcelona, España.

Colaboraciones operativas con otros Centros **Working collaborations with other Institutions:**

Instituto de Química Física, CSIC; Departamento de Química Orgánica, Universidad de Barcelona; Faculté de Pharmacie, Université D'Aix-Marseille; National Institute for Medical Research, Mill Hill, London; Synchrotron Radiation Source, SERC Daresbury Laboratory, U.K.; Zoological Institute, University of Göteborg; Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, MA., U.S.A.

Organismos Financiadores **Funding Agencies**

- DGICYT, PB-PL87 0220 (1998-1993)
- EC Science Program (contract SCI-CT91-0658) (1992-94)
- EC Large Scale Facilities Program/Daresbury Laboratory minor SRS awards (19.09, 20.28) (1991)
- Acciones integradas hispano-francesas (87A, 249B) (1991-1992)

Publicaciones

Publications

- Díaz, J.F. and Andreu, J.M.: Kinetics of dissociation of the tubulin-colchicine complex. Complete reaction scheme and comparison to thermodynamic measurements. *J. Biol. Chem.* 266, 2890-2896, 1991.
- Peyrot, V., Briand, C. and Andreu, J.M.: Limited proteolysis of tubulin by subtilisin induces ring formation. *Amer. Inst. Physics Conf. Proc.* 226, 181-186, 1991.
- Andreu, J.M., García de Ancos, J., Medrano, F.J., Gil, R., Díaz, J.F., Nogales, E., Towns-Andrews, E., Pantos, E. and Bordas, J.: Twelve protofilament taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin. *Amer. Inst. Physics Conf. Proc.* 226, 160-169, 1991.
- Mozo-Villanar, A., Morros, A. and Andreu, J.M.: Thermal transitions in the structure of tubulin. Environments of aromatic amino-acids. *Eur. Biophys. J.* 19, 295-300, 1991.
- Medrano, F.J., Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J. and Timasheff, S.N.: Roles of the ring C oxygens in the binding of colchicine to tubulin. *Biochemistry* 30, 3770-3777, 1991.
- Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J., Medrano, F.J., Rossi, M. and Timasheff, S.N.: Mechanism of colchicine binding to tubulin; tolerance of substituents in ring C' of biphenyl analogues. *Biochemistry* 30, 3777-3786, 1991.
- Timasheff, S.N., Andreu, J.M. and Na, G.N.: Physical and spectroscopic methods for the evaluation of the interactions of anti-mitotic agents with tubulin. *Pharm. Ther.* 52, 191-210, 1991.
- Andreu, J.M.: Tubulin. in: "Human Protein Data". (Ed. A. Haeblerl.) VCH, 1992.
- Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., García de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E. and Towns-Andrews, E.: Low resolution structure of microtubules in solution. Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin in comparison with glycerol- and Map-induced microtubules. *J. Mol. Biol.* 226, 169-184, 1992.
- Peyrot, V., Leynadier, D., Sarrazin, M., Briand, C., Menendez, M., Laynez, J. and Andreu, J.M.: Mechanism of interaction of the new antitumour drug MDL 27048 with the colchicine site of tubulin. Equilibrium studies. *Biochemistry* 31, 11125-11132, 1992.
- Novella, I.S., Andreu, J.M. and Andreu, D.: Chemically synthesized segment 182-235 of tau protein and analogue peptides are efficient microtubule assembly inducers of low apparent specificity. *FEBS Lett.* 311, 235-240, 1992.
- Gil, R.: Cytoskeletal elements of *Frontonia leucas*. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 111, 327-337, 1992.

Fotobioquímica Vegetal

Plant Photobiochemistry

Roberto J. Aparicio

(Jefe de grupo)
(Group leader)

Personal Científico
Tenured Scientist

Concepción Belandín Belandín

Postdoctoral
Postdoctoral Fellow

Federico G. Witt (1992)

Predoctoral
Graduate Student

El NO_3^- es la fuente de nitrógeno más abundante que puede ser asimilada por los organismos fototrofos, como cianobacterias, algas y plantas, los cuales se encuentran en la base de las cadenas tróficas de la biosfera. En estos organismos, la asimilación del NO_3^- está estrechamente ligada a las reacciones luminosas en cuanto a energía metabólica y a señal del medioambiente.

Nuestros resultados anteriores han puesto de manifiesto que las luces UVA y azul promueven la síntesis de la nitrito reductasa, activan la nitrato reductasa y parecen también controlar la entrada de aniones monovalentes en algas verdes. Por otro lado se ha conseguido purificar la nitrato reductasa de *Anabaena* sp. 7119, cianobacteria fijadora de nitrógeno.

Se pretende caracterizar la fotorregulación de la entrada de los aniones monovalentes, como NO_3^- , NO_2^- y Cl^- en relación con la activación de la nitrato reductasa, tanto en algas verdes, como en células estomáticas y mesofílicas de plantas superiores. Igualmente, se intentará caracterizar la naturaleza del foto-

Among the different nitrogen sources available in nature, NO_3^- is one of the most abundant, and can be assimilated by all phototrophic organisms, like cyanobacteria, green algae and higher plants, which are at the base of the trophic chains in the biosphere. In these organisms, the assimilation of NO_3^- is closely related to the light reactions, both energetically and as an environmental signal.

*Our previous results have shown that both UVA and blue light promote the synthesis of nitrite reductase, the activation of nitrate reductase and seem to control, as well, the uptake of monovalent anions by green algae. We were also able to purify nitrate reductase from *Anabaena* sp. 7119, a N_2 fixing cyanobacterium.*

We will intend to characterise the main features of cell uptake of monovalent anions, like NO_3^- , NO_2^- and Cl^- , in relation with the blue light activation of nitrate reductase, both in green algae and guard and mesophilic higher plant cells. The nature of the

receptor de luz UVA y azul. En cianobacterias estos aspectos del metabolismo nitrogenado están aún por estudiar. En estos organismos procarionóticos se intentará además elucidar si la síntesis y actividad de los enzimas implicados en la reducción de NO_3^- a NH_4^+ están igualmente fotorreguladas.

Se espera conseguir la identificación, aislamiento y caracterización del(de los) sistemas de entrada de aniones monovalentes en los organismos mencionados. □

UVA-blue light photoreceptor from eukaryots will be investigated. In cyanobacteria these aspects of their nitrogen metabolism are still to be studied. In these organisms, we will search for the role of light in promoting the synthesis and activity of the enzymes involved in the reduction of NO_3^- to NH_4^+ .

We will attempt to identify, isolate and characterise the uptake system(s) related with the monovalent anions in the above mentioned organisms. □

Organismos Financiadores **Funding Agencies**

- DGICYT, PB(s) 87-0218 (1988-91)
- DGICYT, 87-0204 (1988-92)

Publicaciones **Publications**

- Aparicio, P.J., and Quiñones, M.A.: Blue light, a positive switch signal for nitrate and nitrite uptake by the green alga *Monoraphidium braunii*. *Plant Physiol.* 95, 374-378, 1991.
- Balandin, T., and Aparicio, P.J.: Regulation of nitrate reductase in *Acetabularia mediterranea*. *J. Exp. Bot.* 43, 625-631, 1992.

Fotosíntesis Bacteriana

Bacterial Photosynthesis

Juan M. Ramírez de Verger	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Jesús Zurdo Alaguero		Predoctoral Graduate Student
Concepción Fernández-Cabrera		Personal Técnico Technical Staff

El sistema colector de luz de las bacterias fotosintéticas purpúreas (*Rhodospirillaceae*) está formado por dos o tres tipos de proteínas pigmentadas de bajo peso molecular. Estas proteínas son los componentes intrínsecos más abundantes de la membrana fotosintética bacteriana y contienen bacterioclorofila y carotenoid(es) asociados no covalentemente. Los pigmentos, que constituyen un elevado porcentaje de la masa total de las proteínas (> 20%) son directamente responsables de los procesos de absorción de luz y de transferencia de energía de excitación singlete al centro fotosintético de reacción. El trabajo de nuestro grupo ha estado orientado a caracterizar interacciones específicas pigmento-pigmento y pigmento-proteína y a evaluar la contribución de tales interacciones a la estructura de la proteína y a su función de transferencia de energía de excitación. □

The light-harvesting system of phototrophic purple bacteria (Rhodospirillaceae) consists of a few types of low-molecular-weight pigmented proteins. They are the major integral constituents of the photosynthetic membrane and contain both noncovalently bound bacteriochlorophyll and carotenoid(s) in the prosthetic group which is responsible for light absorption and energy migration to the photochemical reaction centre. Our work has been aimed to characterize specific pigment-pigment and pigment-protein interactions and to evaluate their contribution to protein structure and to excitation energy transfer. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- DGICYT, SEUI PB87-0204 (1988-1992)

Publicaciones

Publications

- Zurdo, J., Lozano, R.M., Fernández-Cabrera C. and Ramírez, J.M.: Dimeric carotenoid interaction in the light-harvesting antenna of purple phototrophic bacteria. *Biochem. J.* 274, 881-884, 1991.
- Zurdo, J., Fernández-Cabrera, C. and Ramírez, J.M.: Enhancement of carotenoid-to-chlorophyll singlet energy transfer by carotenoid-carotenoid interaction. *Biophys. J.* 61, 1462-1469, 1992.
- Ramírez, J.M.: The carotenoid pigments of photosynthetic membranes. In: *Trends in Photosynthesis Research.* (Eds.) J. Barber, M.G. Guerrero y H. Medrano. Intercept, Andover (Hampshire, UK), pp 384-400, 1992.
- Zazo, M., Lozano, R.M., Ortega, R., Varela, J., Díaz-Orejas, R., Ramírez, J.M. and Giménez-Gallego, G.: High level expression in *Escherichia coli* of shortened and full-length acidic fibroblast growth factor. Purification in a form stable in aqueous solutions. *Gene* 113, 231-238, 1992.

Mutagénesis Dirigida de la Proteína Desacoplante Expresada en Levaduras *Site-Directed Mutagenesis of the Uncoupling Protein Expressed in Yeast*

Eduardo Rial Zúco	(Jefe de Grupo) (Group leader)	Personal Científico <i>Tenured Scientist</i>
Ignacio Arechaga Susana Prieto		Predoctorales <i>Graduate Students</i>
Frédéric Boullaud Petr Jezek		Investigadores Asociados <i>Associate Scientists</i>
Pilar Zaragoza Jiménez (Desde V-1991)		Personal Técnico <i>Technical Staff</i>

Se investiga el mecanismo de transporte y de regulación de la proteína desacoplante (UCP). La UCP es un componente exclusivo de las mitocondrias del tejido adiposo pardo, cuya función es permitir la re-entrada de protones a la matriz mitocondrial. Este es por tanto un eficiente mecanismo disipador de energía, ya que desacopla la respiración de la síntesis de ATP. El proyecto de investigación se basa fundamentalmente en el análisis de mutantes de la UCP expresada en levaduras, estudiando las variaciones en las características del transporte y su regulación, y relacionándolas con datos estructurales obtenidos por métodos espectroscópicos. Estos estudios han llevado al descubrimiento de un mecanismo disipador de energía presente en las mitocondrias de *S. cerevisiae*, activado por ATP, y cuyo mecanismo de transporte y regulación es también objeto de investigación. □

*We are investigating the mechanism of transport and regulation of the uncoupling protein (UCP). This protein enables brown adipose tissue mitochondria to uncouple respiration from ATP synthesis by catalyzing re-entry of protons extruded by the respiratory chain and it is therefore an efficient energy dissipating mechanism. The project is based on the analysis of UCP mutants expressed in yeasts, studying the changes induced in the transport properties and relating them with variations in structure determined by spectroscopic methods. This work has led to the discovery of an energy dissipating mechanism in *S. cerevisiae* mitochondria, activated by ATP, and whose transport mechanism and regulation is currently being investigated. □*

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- DGICYT, PB87-020 (1988-1993)
- Proyecto de Cooperación CSIC-INSERM (1991)
- Acción Integrada Hispano-Francesa (HF-274)

Publicaciones

Publications

- Prieto, S., Bouillaud, F., Ricquier, D. and Rial, E.: Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 208, 487-491, 1992.
- Viguera, A.R., Gofii, F.M. and Rial, E.: The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria: the environment of the tryptophan residues as revealed by quenching of the intrinsic fluorescence. *Eur. J. Biochem.* 210, 893-899, 1992.
- Miroux, B., Doucier-Cassard, A.M., Castella, L., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Gelly, C., Klaus, S., Prieto, S., Rial, E., Bouillaud, F. and Ricquier, D.: Molecular studies of the mitochondrial uncoupling protein. In: *Molecular Biology of Mitochondrial Transport Systems*. (Eds.) M. Forte and M. Colombini. Springer-Verlag, Berlin, 1992.

Proteínas de *Leishmania*

Leishmania Proteins

Luis Rivas López (Lab. 1)	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Carmen Chicharro Pilar Díaz Achirica		Predoctorales Graduate Students
Vicente Larraga (Lab. 2)	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Gloria Gonzalez		Predocctoral Graduate Student
Alberto Marquet (Lab. 3)	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist

Estudio molecular de la cisteína proteinasa de *Trypanosomatidae*

Molecular characterization of cysteine proteinases from Trypanosomatidae

Un 1% de las proteínas totales del amastigote de *L. pifanoi* está constituido por una cisteína proteinasa con masa molecular de 30 kDa. Dicha proteína presenta alta homología con la cathepsina L de vertebrados superiores tanto en su secuencia primaria como en la especificidad de sustrato. El papel que tal proteína juega en el mecanismo de la enfermedad es desconocido, aunque es reconocida por anticuerpos de pacientes infectados y su actividad se restringe a la forma intracelular o amastigote. La línea de trabajo pretende:

a).-Conocer cómo es la regulación de su función en el parásito, por identificación de inhibidores específicos de la proteinasa propios del parásito. Mediante cromatografía de afinidad sobre cisteína proteinasas se han purificado varias proteínas del parásito capaces de inhibir la cisteína proteinasa, cuya

A cysteine proteinase with a molecular weight of 30 kDa accounts for 1% of the total protein in Leishmania pifanoi amastigotes. This protein shows a high sequential and substrate specificity with cathepsin L from higher eukaryotes. Although the protein is recognized by antibodies from patients sera, its role in the infection is unknown. Its expression is restricted to the intracellular form of the parasite. The aims of the project are:

a).-To know how the proteinase activity is regulated by the parasite, by identification of specific inhibitors such as cystatin-like molecules synthesized by *Leishmania*. We have identified four proteins by affinity chromatography on papain-Sepharose able to inhibit the proteinase activity. Their biochemical characterization is in course.

caracterización bioquímica está en curso.

b).-Estudio de la posible alteración por la cisteín-proteinasa de la función del macrófago en la presentación de antígeno exógeno (lactalbúmina), e identificación de posibles epitopos T dentro de la cisteína proteinasa mediante estudio de la proliferación de líneas T que reconocen la proteinasa, por diversos péptidos sintéticos basados en la secuencia de la misma, en colaboración con el Dr. F. Leyva-Cobián (Hospital Marqués de Valdecilla, Santander).

Caracterización de Gp46 y Gp63 de *L. infantum*.

L. infantum es la especie de *Leishmania* responsable de la enfermedad en la Cuenca Mediterránea septentrional tanto en humanos como en perro, siendo éste el principal reservorio de la enfermedad. Las proteínas Gp46 y Gp63 de otras especies de *Leishmania* han inducido protección parcial en animales de laboratorio. El proyecto consta de las siguientes partes:

a).-Purificación y caracterización bioquímica de Gp46 y Gp63 de *L. infantum* y su función como posibles antígenos protectores. La purificación está en curso. Ambas son proteínas abundantes en la membrana del parásito y presentan reacción cruzada con proteínas homólogas de otras especies.

b).- Obtención de genotecas cDNA y genómicas en lambda ZAP II. Clonaje de los genes correspondientes identificados mediante oligonucleótidos basa-

b).-*To study the possible modification in the function of the infected macrophage due to the proteinase, such as overdegradation of exogenous antigens (lactalbumin) by the proteinase, and also the study of T cell epitopes in the molecule by proliferation of T cell lines specific for the proteinase, using synthetic peptides corresponding to different parts of the molecule. This work is made in collaboration with Dr. Leyva-Cobián (Hospital Marqués de Valdecilla, Santander).*

Characterization of Gp46 and Gp63 from *L. infantum*.

In the European Mediterranean Basin, leishmaniasis in human and dogs is produced by Leishmania infantum. Gp46 and Gp63 are two of the major components of the plasma membrane of the parasite. These proteins, isolated from other Leishmania species produce high levels of protection in laboratory animals against challenge with parasites of the same species.

The project deals with development of a vaccine against the parasite by three different approaches each of them developed by the different laboratories of the group:

a).-*Purification and biochemical characterization of Gp46 and Gp63 from *L. infantum*, and their use as purified antigens in protection experiments.*

b).- *Construction of cDNA and genomic libraries from *L. infantum* in*

dos en la secuencia de Gp46 de *L. amazonensis*. Una vez obtenidos los genes serán secuenciados y la secuencia será utilizada como base para desarrollo de una posible vacuna sintética.

c).-Expresión de proteínas en virus *Vaccinia* atenuados como posible desarrollo para una vacuna veterinaria por recombinantes vivos (Colaboración con Dr. M. Esteban, CNB, Madrid). □

lambda ZAP II. To clone the corresponding genes and to obtain the sequence to be used for the synthesis of peptides containing T cell epitopes

c).- To produce recombinant *Vaccinia attenuated virus* as a possible vaccine of the wild reservoirs of the diseases. This work is being made in collaboration with Dr. M Esteban (C.N.B. Madrid). □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- CICYT, BIO88-0229-CO2-01 (1989-1991)
- CAM, 093A/92 (1992)
- CAM, 093B/92. (1992)
- CEE, PVD: CI1*-CT91-0870(1991-1993)
- CICYT, BIO92-0936-C02-01 (1992-1994)
- CAM, C178/91-93

Publicaciones Publications

- Rivas, L., Kahl, L., Manson, K. and McMahon-Pratt, D.: Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 235-244, 1991.
- Ramos-Ruiz, R., Lopez-Bote, J.P., Pelayo, F., Larraga, V. and Bernabeu, C.: Cellular and humoral reactivity pattern to the mycobacterial heat shock protein hsp65 in Adjuvant Arthritis susceptible and resistant Wistar rats. *Autoimmunity* 1, 1-5, 1991.
- Ramos-Ruiz, R., Bernabeu, C., Ariza, A. Larraga, V. and Lopez-Bote, J.P.: Synoviocyte transferred arthritis in rats. *J. Autoimmun.* 5, 93-106, 1992.
- Ramos-Ruiz, R., Avila, J., Lopez-Bote, J.P., Bernabeu, C. and Larraga, V.: Decreased tubulin synthesis in synoviocytes from antigen induced arthritic rats. *Biochem. Biophys. Acta.* 1138, 184-190, 1992.
- Rivas, L.: Vacunación en Leishmaniasis: Gp46 de *Leishmania amazonensis* como antígeno protector. *Rev. R. Acad. C. Nat.* 86, 103-120, 1992.

Replicación y Mantenimiento de Plásmidos Bacterianos

Replication and Maintenance of Bacterial Plasmids

Ramón Díaz Orejas (Jefe de grupo) *Personal Científico*
(Group leader) *Tenured Scientists*

M^a Elena Fernández-Tresguerres
Gertrudis de Torrontegui

Rafael Giraldo Suárez
M^a Jesús Ruíz Echevarría
M^a Angeles de la Torre

Postdoctorales
Postdoctoral Fellows

Darío García de Viedma
Juan M. Sánchez Romero

Predoctorales
Graduate Students

Consuelo Pardo Abarrio
Ana M^a Serrano López

Personal Técnico
Technical Staff



El grupo estudia mediante un análisis genético-bioquímico la replicación y sistemas de estabilidad de plásmidos de bacterias gram-negativas con particular énfasis en el factor de resistencia a antibióticos de enterobacterias R1 y en el plásmido pPS10 de *Pseudomonas*. Los estudios de replicación se centran en la iniciación del proceso replicativo y en particular en las interacciones de las proteínas iniciadoras de R1 y pPS10 con secuencias específicas del correspondiente origen de replicación y con componentes de la maquinaria replicativa del huésped, en especial la proteína DnaA. La proteína de replicación of pPS10 es también un regulador transcripcional de su propia síntesis y los estudios con esta proteína incluyen en consecuencia un análisis de las interacciones proteína-DNA y proteína-proteína a la base de la actividad reguladora de la misma y una evaluación de las interrelaciones entre activación de replica-

Our group studies, combining genetical and biochemical approaches, the replication mechanisms and stability systems of the antibiotic resistance factor R1 of Enterobacteria and of plasmid pPS10 of Pseudomonas. Plasmid replication studies are centered in the analysis of the initiation of replication and particularly in the interactions of the specific initiator proteins of R1 and pPS10 with specific sequences of their origins of replication as well as with components of the replication machinery of the host and in particular with the DnaA initiator protein. The replication protein of plasmid pPS10 is also a transcriptional regulator of their own synthesis and studies with this protein include the analysis of the protein-DNA and protein-protein interactions at the basis of this regulatory activity and the interrelations between activation of replication and repression mediated by the

Funciones de mantenimiento e implicaciones medioambientales de plásmidos bacterianos

Maintenance functions and environmental implications of bacterial plasmids

ción y represión mediadas por ella. Los estudios sobre sistemas de estabilidad se centran en el sistema *parD* del plásmido R1, que es un sistema tipo *killer* que actúan contraseleccionando segregantes. Los estudios sobre *parD* ponen el énfasis de la regulación del sistema, mecanismo de acción de sus componentes e interrelaciones del sistema *parD* con otros dos sistemas de estabilidad, *parA* y *parB*, presentes en el plásmido R1.

Los plásmidos bacterianos actúan como agentes muy eficaces de intercambio genético en las poblaciones bacterianas naturales, favoreciendo la rápida adaptación de estas poblaciones a los cambios introducidos en su medioambiente y contribuyendo eficazmente al mantenimiento de la diversidad microbiana en la naturaleza. El grupo está interesado en profundizar en tres aspectos de nuestros estudios que tienen relevancia en el contexto de transferencias genéticas promovidas por plásmidos en medioambiente: i) caracterización y evaluación, tanto en cultivos controlados como en sistemas medioambientales modelo (microcosmos), de los factores que determinan y limitan la promiscuidad del replicón pPS10 así como del potencial de adaptación genética y fisiológica de este replicón a nuevos huéspedes, ii) diseño y desarrollo de vectores de clonación, tipo pPS10, específicamente indicados para la construcción de estirpes de *Pseudomonas* con aplicación medioambiental, iii) evaluación, tanto en cultivos controlados como en microcosmos, del potencial del sistema *parD* para estabilizar los vectores de clonación pPS10 y para introducir en ellos esquemas de contenimiento biológico. □

protein. The studies on plasmid stability systems are centered in the parD system of plasmid R1, that is a "killer"-type stability system that acts counterselecting plasmid-free segregates. The analysis of this system focuses in the regulation of the system, the mechanism of action of their components and the interrelations of the parD stability system with two additional stability systems, parA and parB, present in plasmid R1.

Bacterial plasmids are efficient agents in the genetic interchange that occurs in the natural bacterial populations; they favour a rapid adaptation of these populations to environmental changes and contribute efficiently to the maintenance of the bacterial diversity in the natural bacterial populations. Our group is interested in exploring three different aspects of our studies that are relevant in the context of gene-flux promoted by plasmids in the environment: i) characterization, both in controlled culture conditions as well as in "microcosm's" model systems, of the factors that determine and limit the promiscuity of the pPS10 replicon, and analysis of the potential of this replicon to colonize new hosts, ii) development of pPS10-type cloning vector specifically tailored for the construction of strains of Pseudomonas for environmental applications, iii) evaluation, both in controlled culture conditions as well as in microcosm's model systems, of the potential of the parD system to stabilize the pPS10 cloning vectors and to implement schemes of biological containment in these vectors. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- CICYT, BIO88-0249 (1988-1991)
- CICYT, BIO89-0497 (1989-1992)
- CICYT, BIO91-1055 (1991-1993)

Publicaciones
Publications

- Berzal-Herranz, A., Wagner, E.G.H. and Díaz-Orejas, R. Control of replication of plasmid R1: the intergenic region between *copA* and *repA* modulates the level of expression of *repA*. *Mol. Microbiol.* 5, 97-106, 1991.
- Ruiz-Echevarría, M.J., de Torrontegui, G., Giménez-Gallego, G., and Díaz-Orejas, R. Structural and functional comparison between the stability systems *parD* of plasmid R1 and *cod* of plasmid F. *Mol. Gen. Genetics*, 225, 355-362, 1991.
- Ruiz-Echevarría, M.J., Berzal-Herranz, A., Gerdes, K. and Díaz-Orejas, R. The *kis* and *kid* genes of *parD* maintenance system of plasmid R1 form an operon that is autoregulated at the level of transcription by the coordinate action of the Kis and Kid proteins. *Mol. Microbiol.* 5, 2685-2693, 1991.
- Nieto, C., Giraldo, R., Fernández-Tresguerres, M.E., and Díaz-Orejas, R. Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific of *Pseudomonas* isolated from *Pseudomonas syringae patovar savastanoi*. *J. Mol. Biol.* 223, 415-426, 1992.
- Giraldo, R., Martín, M., Fernández-Tresguerres, M.E., Nieto, C., and Díaz, R. Mutations within the minimal replicon of plasmid pPS10 increase its host range. In: *DNA Replication; the regulatory mechanisms*. (Eds.) Hughes, Fanning and Kohiyama. Springer Verlag. Berlin. pgs. 225-237, 1992.
- Zazo, M., Lozano, R.M., Ortega, S., Varela, J., Díaz-Orejas, R., Ramírez, J.M. and Giménez-Gallego, G. High-level synthesis in *Escherichia coli* of shortened and full-length human acidic fibroblast growth factor and purification in a form stable in aqueous solutions. *Gene*, 113, 231-236, 1992.
- Ortega, S., Giraldo, R., Fernández-Tresguerres, M.E., Berzal-Herranz, A., and Díaz-Orejas, R. DnaA-dependent replication of plasmid R1 in the absence of the *dnaA* box present in *oriR*. *Nucl. Acids Res.* 20, 2547-2551, 1992.
- Giraldo, R., and Díaz, R. The differential binding of wild-type and a mutant RepA protein to *oriR* sequence suggest a model for the initiation of plasmid R1 replication. *J. Mol. Biol.* 228, 767-802, 1992.

Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-Positivas

Replication and Expression of DNA in Gram-Positive Bacteria

Manuel Espinosa Padrón (Jefe de grupo) Personal Científico
(Group leader) *Tenured Scientists*

María Teresa Pérez-Ureña

Antonio Puyet Catalina

Gloria del Solar Dongil

Postdoctorales

Postdoctoral Fellows

Paloma Acebo País

Miriam Moscoso Naya

José Pérez-Martín

(Hasta III-1992)

Predctorales

Graduates/Students

Gabriela Kramer Xavler

Ana M. Hernández Arriaga

(Desde IX-1992)

Pregraduados

Undergraduate Students

Ana Margarita Ibáñez

(Desde X-1992)

Investigadora Asociada

Associate Scientist

M^o Teresa Alda López

Personal Técnico

Technical Staff



Vectores de clonaje basados en plásmidos de amplio espectro de huésped. Replicación y reparación del DNA.

Replicación del plásmido pLS1. Este plásmido tiene interés por dos razones: i) su promiscuidad le permite establecerse en varios huéspedes, y ii) comparte características con replicones Gram-negativos y Gram-positivos. Se ha purificado la proteína CopG (antes, RepA) codificada por pLS1, la cual se sintetiza como un dímero de subunidades idénticas. Se ha caracterizado su función como represor transcripcional *in vivo* e *in vitro*. La región de unión de CopG a DNA presenta un elemento de secuencia simétrico de 13 pares de bases. CopG induce curvaturas en la región del DNA a la que se une. Se

Plasmid pLS1 replication. *Plasmid pLS1 is interesting because: i) it can be established in a variety of hosts, and ii) it shares features with Gram-positive and -negative replicons. We have purified the plasmid-encoded CopG (formerly RepA) protein and characterized its role as transcriptional repressor, in vivo and in vitro. CopG binds to a region containing a symmetric 13-bp element. Upon binding, CopG induces a strong DNA bend. By proper positioning of the CopG-target and a reporter promoter, we have shown that the*

ha mostrado que las curvaturas generadas por CopG sobre el DNA, juegan un papel importante en la expresión génica: mediante posicionamiento adecuado de la diana de CopG y las secuencias -35 y -10 de un promotor, fué posible convertir la actividad represora de CopG en activadora de la transcripción. Se ha iniciado el estudio del papel regulador del RNA "antisense", ctRNA II, sobre el número de copias de pLS1. Se ha purificado la proteína RepB, iniciadora de la replicación, y ensayado su actividad sobre DNA plasmídico superenrollado. Se ha definido el origen mínimo de replicación de pLS1.

Control de la replicación y de la expresión génica en sistemas huésped/plásmido de bacterias gram-positivas.

(Proyecto en cooperación con el grupo de la Dra. Paloma López).

Clonaje y expresión de genes. Se ha clonado un fragmento de DNA que contiene el gen de la timidilato sintetasa (TDS) de *S. pneumoniae*, mediante selección por sensibilidad a trimetoprim. Se han realizado ensayos de complementación *in vivo* entre el gen de pneumococos y sus equivalentes en *B. subtilis* y *E. coli*.

Ruta biosintética de utilización de maltosacáridos por *S.pneumoniae*. Se ha clonado y secuenciado una región cromosómica de pneumococos que contiene el operón de utilización de maltosacáridos (*mal*). Además de los genes *malX* y *malD*, cuya existencia estaba descrita por métodos genéticos, se han encontrado dos nuevos genes en esta región. También se ha clonado y secuenciado el gen *malR*, represor del operón. □

repressor could be turned into a transcriptional activator. We have initiated the analysis of the regulatory role of a small antisense RNA (RNA II), encoded by pLS1. The initiator of replication RepB protein has been purified, and its activity on supercoiled plasmid DNA has been assayed. The minimal origin of replication of pLS1 has been defined.

Control of replication and gene expression in host/plasmid systems of gram-positive bacteria.

(Project in cooperation with the group of Dr. Paloma López).

Cloning and expression of genes. A 8kb-chromosomal DNA fragment from *Streptococcus pneumoniae* has been cloned into pLS1. Within it, the gene encoding the thymidilate synthase is contained. *In vivo complementation tests between the pneumococcal gene and its B.subtilis and E.coli counterparts have been performed.*

Biosynthetic pathway for maltosaccharides utilization by *S.pneumoniae*. We have cloned and sequenced a chromosomal region containing the entire pneumococcal maltose operon (*mal*). In addition to the genetically described *malX* and *malD* genes, two new genes have been found. The *malR* (repressor) gene has been also cloned and sequenced. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- CICYT, BIO88/0449 (1989-1991)
- CICYT, BIO91/0691 (1991-94)
- CICYT, BIO92-1018-CO2-02 (1992-1994)
- CAM, 190/92 (1992-1994)

Publicaciones
Publications

- Del Solar, G., and Espinosa, M.: Labelling DNA ends with the Klenow fragment of the *E.coli* DNA polymerase I: a cautionary note. *Nucl. Acids Res.* 19, 1956, 1991.
- Pérez-Martín, J., and Espinosa, M.: The RepA repressor can act as a transcriptional activator by inducing DNA bends. *EMBO J.* 10, 1375-1382, 1991.
- Del Solar, G., and Espinosa, M.: The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the anti-sense RNA II and the repressor protein RepA. *Mol. Microbiol.* 6: 83-94, 1992.
- Pérez-Martín, J., and Espinosa, M.: A genetic system to study the *in vivo* role of transcriptional regulators in *Escherichia coli*. *Gene* 116, 75-80, 1992.

Biología Molecular de Bacterias Gram-Positivas

Molecular Biology of Gram-positive Bacteria

Paloma López García	(Jefe de Grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Asunción Carrasco Díaz Félix López de Felipe		Predoctorales Graduate Students
Javier Sarraseca Madrigal Pedro Vallente García		Personal Técnico Technical Staff



La DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* (Spn Poll), codificada por el gen *polA*, es una proteína multifuncional. Se ha establecido que la DNA polimerasa, además de su actividad polimerizante, posee actividad exonucleolítica 5'-3' y carece de actividad exonucleásica correctora 3'-5'. Los dominios de actividad exonucleásica y polimerasa están localizados respectivamente en las regiones amino y carboxilo terminales de Spn Poll. El enzima silvestre y su dominio polimerizante (Spn Pollc269) son capaces de sustituir *in vivo* la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* en procesos de reparación de DNA. Sin embargo, el dominio de actividad exonucleolítica 5'-3' de Spn Poll no puede complementar funcionalmente los mutantes de *E. coli* deficientes en actividad exonucleásica 5'-3'. La construcción de estirpes con mutaciones en el gen *polA* ha permitido establecer que la actividad nucleásica de la DNA polimerasa I es un requerimiento esencial para la viabilidad de *S. pneumoniae*.

The Streptococcus pneumoniae DNA polymerase I (Spn Poll) encoded by its polA gene is a multifunctional protein. Spn Poll possesses 5'-3' exonuclease as well as DNA polymerase activities and it lacks the 3'-5' proofreading exonuclease activity detected in Eco Poll. The exonuclease and polymerase domains are located respectively at the N-terminal and at the C-terminal regions of Spn Poll. Both Spn Poll and its polymerase domain (Spn Pollc269) are able to substitute in vivo for the Eco Poll in DNA repair processes. However, the 5'-3' exonuclease domain of Spn Poll can not functionally complement 5'-3' exonuclease mutants of E. coli. In contrast to the Eco Poll, the nuclease activity of Spn Poll is essential for S. pneumoniae viability. Furthermore, the polymerase activity of

La DNA polimerasa I de *Streptococcus pneumoniae*: caracterización bioquímica, estructural y funcional.

***Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I: Biochemical, structural and functional characterization.**

Asimismo, la polimerización de DNA catalizada por esta proteína es requerida para la reparación de lesiones producidas por irradiación con luz ultravioleta en *S. pneumoniae*. Se ha subclonado la región del gen *polA* que codifica para el dominio de actividad nucleásica. Dos polipéptidos mutantes carentes de actividad polimerásica han sido hiperproducidos y purificados y se ha comenzado la caracterización *in vitro* de la actividad exonucleásica 5'-3'.

Estudios del transporte de citrato en bacterias lácticas

Esta línea de trabajo se ha iniciado en 1991. La utilización de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* como productor de aroma en fermentaciones lácticas a nivel industrial, es dependiente de la capacidad de dicho microorganismo para producir diacetilo a partir de citrato. El transporte de citrato en *L. lactis* biovar *diacetylactis* está mediado por la citrato permeasa (CitP); esta proteína está codificada por el gen *citP* presente en un plásmido de 8,0 kb. En nuestro laboratorio hemos establecido que la expresión del gen *citP* no es inducida por la presencia de citrato en el medio de cultivo. El análisis transcripcional del gen *citP* en *L. lactis* ha mostrado la presencia de dos mRNA transcritos con una longitud de 2900 (mRNA1) y 1900 (mRNA2) nucleótidos. Los sitios de iniciación de ambos transcritos, así como su sitio común de terminación han sido mapeados. mRNA1 es sintetizado durante la fase exponencial de crecimiento mientras que mRNA2 está presente en las células durante la fase estacionaria. mRNA1 codifica dos polipéptidos de 6 y 14 kDa, además de CitP. Los niveles de CitP en las células están controlados por el polipéptido de 14 kDa, un regulador transcripcional con fun-

Spn Poll is required in S. pneumoniae for DNA repair processed upon ultraviolet irradiation. The 5'-3' exonuclease coding region was subcloned. Two mutant polypeptides lacking the polymerase activity were overproduced and purified. We are currently characterizing Spn Poll enzymatic activities as well as DNA-protein interactions by enzymological, genetic, genetic engineering and biophysical studies.

Studies of the citrate transport in Lactic Acid Bacteria.

The use of Lactococcus lactis biovar diacetylactis as a flavor producer in dairy fermentations is dependent upon its ability to produce diacetyl from citrate. The ability of this bacteria to transport citrate is due to the citrate permease P (CitP) encoded by the citP gene located in a 8.0 kb plasmid. The citP gene expression is not induced by the presence of citrate in the growth medium. Transcriptional analysis of citP gene in L. lactis showed the presence of two mRNA transcripts 2900 (mRNA1) and 1900 (mRNA2) nucleotides long. The initiation of the two transcripts as well as their common end point were mapped in the DNA. mRNA1 is synthesized during exponential growth, whereas mRNA2 is present in the cells during the stationary phase of growth. mRNA1 encodes, in addition to CitP, a 6 kDa and a 14 kDa polypeptides. The 14 kDa polypeptide exerts a positive and

ción dual como activador y represor. Este regulador ejerce respectivamente un control positivo y negativo sobre la síntesis de mRNA1 y mRNA2. Actualmente estamos caracterizando el mecanismo de regulación del polipéptido de 14 kDa sobre la síntesis de CitP mediante correlación de análisis mutacional del regulador con la expresión génica de la citrato permeasa. □

negative control on the synthesis of mRNA1 and mRNA2, respectively. We are currently characterizing the regulatory mechanism of the 14 kDa polypeptide on the synthesis of CitP by mutational analysis and in vivo and in vitro studies. □

Organismos financiadores

Funding Agencies

- CAM, C171/90 (1991-1992)
- NATO, 0119/88 (1988 -)
- CEE, CI1-CT90-0772 (1991-1993)
- CICYT, BIO092-1164-CE (1992)

Patentes

Patents

-López, P., Pons, M.E., Díaz, A., Espinosa, M. y Lacks, S.A.: Procedure of high expression and purification of the carboxyl-terminal fragment of the *Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I. Patente europea N° PCT/ES 91/00010. 1991.

-López, P., López de Felipe, Magni, C. y de Mendoza, D.: Procedimiento de obtención y sobreexpresión constitutiva de la citrato permeasa P de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. Patente española N° 9201646. 1992.

Publicaciones

Publications

-Pons, M.E., Díaz, A., Lacks, S.A. and López, P.: The polymerase domain of *Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I. High expression, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 201, 147-155, 1991.

-Díaz, A., Pons, M.E., Lacks, S.A. and López, P.: *Streptococcus pneumoniae* DNA I lacks 3' to 5' exonuclease activity. Localization of its 5' to 3' exonucleolytic domain. *J. Bacteriol.* 174, 2014-2024, 1992.

-Díaz, A., Lacks, S.A. and López, P.: The 5' and 3' exonuclease activity of DNA polymerase I is essential for *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 6, 3009-3019, 1992.

Genética Molecular de *Pseudomonas* *Molecular genetics of Pseudomonas*

Víctor de Lorenzo Prieto	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Jose Luis Martínez Menéndez José Perez Martín		Postdoctorales Postdoctoral Fellows
Ildefonso Cases Díaz Silvia Fernández-Hernández Amparo Haro Castuera		Predoctorales Graduate Students



Sistemas vector-huésped para la ingeniería genética de *Pseudomonas* para aplicaciones medioambientales. La liberación al medio ambiente de microorganismos mejorados genéticamente (MMGs) en su capacidad biodegradativa sobre compuestos xenobióticos plantea una variedad de problemas relacionados con su predecibilidad ecológica. Dos problemas centrales son el mantenimiento estable del fenotipo recombinante en situaciones no-contenidas, alejadas de las condiciones controladas del Laboratorio, y la expresión eficaz de ese fenotipo como respuesta a señales presentes en el hábitat a donde están destinados los MMGs. En este contexto, nuestro Laboratorio ha venido trabajando en los últimos años en el desarrollo de vectores-transposones para la inserción estable de DNA heterólogo en el cromosoma de bacterias Gram-

Host-vector systems for the genetic engineering of Pseudomonas for environmental applications. Deliberate release of Genetically engineered microorganisms (GEMs) which have been improved in their biodegradative properties for xenobiotic compounds poses a number of problems related to their ecological predictability. Two central aspects of such predictability are the stable maintenance of the recombinant phenotype in non-contained situations (i.e. those different from the controlled conditions prevailing in the Laboratory) and the efficient expression of such phenotype in response to signals present in the location where the GEMs are expected to perform. In this context, our Laboratory has been working over the last few years in the construction of transposon-vectors for the stable insertion of cloned DNA into the chro-

negativas, en particular *Pseudomonas putida*. Nuestro trabajo se ha centrado en la puesta a punto de sistemas de expresión heteróloga construidos dentro de estos vectores-transposones y basados bien en promotores regulados de rutas biodegradativas TOL (tolueno) y NAH (naftaleno) de *Pseudomonas* o bien en promotores particularmente activos en condiciones de privación de nutrientes o crecimiento lento. Nuestros intereses actuales se dirigen al desarrollo de métodos no-disruptivos (inmunológicos y/o basados en emisión de luminiscencia) para la monitorización de MMGs y para la evaluación de la actividad transcripcional de promotores catabólicos en muestras medioambientales.

Regulación transcripcional de promotores de rutas biodegradativas para compuestos halo- y alquil-aromáticos de *Pseudomonas putida*. La eficacia de las rutas catabólicas de *Pseudomonas* para compuestos aromáticos (que originan una parte muy significativa de la contaminación química del medio ambiente) viene limitada numerosas veces por la incapacidad del sustrato de la ruta para activar la transcripción de los genes correspondientes. Para superar los *cuellos de botella* reguladores que limitan una manifestación completa y eficiente del fenotipo biodegradativo es esencial entender los mecanismos moleculares que influyen en su expresión. Nuestra atención se ha centrado en el promotor *Pu* de la ru-

mosome of Gram-negative eubacteria, in particular P. putida. Our recent work has been focused on the development of heterologous expression systems engineered within these transposons and based on the inclusion of regulated promoters of biodegradative pathways TOL (toluene) and NAH (naphthalene) of Pseudomonas putida, as well as on promoters which are particularly active under starvation conditions and reduced growth rate. Our current interests include the development of non-disruptive methods (mostly based on immunofluorescence and light emission) for monitoring GEMs and to examine the activity of catabolic promoters in environmental samples.

Transcriptional regulation of promoters of biodegradative pathways of Pseudomonas putida for the catabolism of halo- and alkyl-aromatic compounds. The efficiency of biodegradative routes of *Pseudomonas* on aromatic compounds (which constitute a major kind of environmental pollutants) is often limited by the poor transcription of the cognate catabolic genes when cells are exposed to potential pathway substrates. To remove the regulatory bottlenecks which hinder the full expression of the biodegradative phenotype, it is essential to understand the molecular mechanisms which control its expression. We have used as working systems the *Pu* promoter of the TOL pathway for the catabolism of toluene and xylenes in *Pseudomonas putida* and

ta TOL de biodegradación de tolueno/xilenos de *P. putida* y en el promotor *Pbph* del operón de catabolismo de policloro bifenilos (PCBs) de la cepa *Pseudomonas* sp. LB400. En el primer caso, el promotor pertenece a la familia de los dependientes de factor σ^{54} y su regulación está sujeta a una variedad de controles, tales como la proteína XylR, IHF (factor de integración del huésped) y la fase de crecimiento. Tanto en el caso de *Pu* como en *Pbph*, nuestros esfuerzos se dirigen a conseguir promotores alterados susceptibles de activación por una mayor variedad estructural de efectores o por concentraciones muy inferiores de éstos, de cara a aumentar la eficiencia biodegradativa de la ruta correspondiente. □

the *Pbph* promoter of an operon for the biotransformation of polychloro biphenyls (PCBs) into chlorobenzoates, present in strain *Pseudomonas* sp. LB400. In the first case, the promoter belongs to the family of those dependent on σ^{54} and its regulation is subjected to various controls, including the XylR protein, IHF (integration host factor) and growth phase. In both cases (*Pu* and *Pbph*), our current efforts are directed to achieve mutant promoter/regulator pairs responsive to a wider variety of structural congeners of the substrates of the pathways and the construction of promoters responsive to lower concentrations of pollutant in view of their potential effect to increase the efficiency of the corresponding biodegradative route. □

Organismos Financiadores **Funding Agencies**

- CICYT, BIO89-0497 (1990-1992)
- CEE, BRIDGE PL 900006 (Contrac BIO-CT91-0293) (1991-1993)
- CAM C260/91 (1992-1994)

Publicaciones **Publications**

- Lorenzo, V. de, Herrero, M., Metzke, M. and Timmis, K.N.: An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the σ^{54} -dependent *Pu* promoter of TOL plasmid. *EMBO J.* 10, 1159-1167. 1991.
- Buyer, J., Lorenzo, V. de, and Neilands, J.B.: Production of siderophore aerobactin by a halophilic *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2246-2250. 1991.
- Michán, C., Kessler, B., Lorenzo, V. de, Timmis, K. and Ramos, J.L.: XylS domain interactions can be deduced from intraallelic dominance in double mutants. *Mol. Gen. Genet.* 235 : 406-412. 1992.

Publicaciones (continuación)

Publications (continued)

- Lorenzo, V. de, and Timmis, K.N.: Specialized host-vector systems for the engineering of *Pseudomonas* strains destined for environmental release. In: *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Association of Microbiology, Washington D.C. pp. 415-428. 1992.
- Kessler, B., Lorenzo, V. de, and Timmis, K.N.: A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of Gram-negative eubacteria: Regulation of the P_m promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genetics* 233: 293-301. 1992.
- Lorenzo, V. de,: Genetic engineering strategies for environmental applications. *Current Opinion Biotechnology* 3: 227-231. 1992.
- Su, G., Brahmhatt, H., de Lorenzo, V., Weiland, J., and Timmis, K.: Extracellular export of Shiga toxin B subunit/haemolysin A (C-terminus) fusion protein expressed in *Salmonella thyphimurium* *aroA*-mutant and stimulation of B-subunit specific antibody responses in mice. *Microb. Pathogenesis* 13, 465-476. 1992.

Control Genético del Ciclo Celular

Genetic Control of the Cell Cycle

Miguel Vicente

(Jefe de Grupo)
(Group leader)

Personal Científico
Tenured Scientist

Martí Aldea (Hasta VIII-91)
Teresa Garrido

Postdoctorales
Postdoctoral Fellows

Manuel Sánchez
M^a José Ferrándiz (1992)
Ana Martínez
(a tiempo parcial)

Predoctorales
Graduate Students

Manuel Ballesteros
Lucía Yim

Pregraduados
Undergraduate Students

Miguel Arranz (1992)
Pilar Palacios
Pilar Zaragoza (Hasta IV-91)

Personal Técnico
Technical Staff



Análisis molecular de la división bacteriana. Los componentes y los circuitos reguladores

Molecular analysis of bacterial cell division. The building blocks and the expression of genes.

El promotor *Gearbox* (Caja de cambios) de *bolA* contiene regiones -10, -35 y de cabecera específicas (Vicente *et al.* 1991. *Mol. Microbiol.* 5: 2085-2091). Las *gearboxes* permiten la expresión de genes de una forma que asegura la producción de cantidades constantes de producto independientemente de la velocidad de crecimiento del cultivo. De esta forma los genes controlados por *gearboxes* se expresan incluso en los cultivos que entran en fase estacionaria. La cantidad de transcripción, relativa a los demás genes celulares, aumenta cuando disminuye la velocidad de crecimiento. El papel de la región -10 se ha determinado por mutagénesis dirigida (Aldea *et al.* 1990. *EMBO J.* 9: 3787-3794). Ahora estamos introduciendo mutaciones al azar por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en otras posiciones del frag-

The Gearbox promoter at bolA comprises specific -10, -35, and upstream regions (Vicente et al. 1991. Mol. Microbiol. 5: 2085-2091). Gearboxes allow the expression of genes in a way that ensures the production of transcripts at constant amounts independently of the growth rate of the culture. This means that the genes controlled by gearboxes are expressed even in cultures entering stationary phase. Moreover the amount of transcription, relative to the rest of the cellular genes, is higher as the growth rate diminishes. The role of -10 has been investigated by site directed mutagenesis (Aldea et al. 1990. EMBO J. 9: 3787-3794). We are now introducing mutations in other sites of the 53 bp fragment, that contains all the gearbox features, by random PCR directed mutagenesis.

mento de 53 bp que contiene todos los elementos de la *gearbox* de *bolA*. Deseamos obtener mutaciones que activen el promotor para ampliar las posibles aplicaciones de éste sistema. Asimismo obtendremos un mapa funcional de una *gearbox*. Hemos analizado la expresión de *ftsZ*, un gen esencial de división, y encontramos que es cíclica, dependiente del ciclo celular.

Las proteínas de división celular ofrecen la posibilidad de definir nuevos blancos susceptibles de inhibición por nuevos medicamentos. Uno de los problemas que frena esta línea de investigación es el desconocimiento que existe sobre su función bioquímica. Estamos intentando definir dominios funcionales en la proteína FtsA. Varias son las razones que hacen a esta proteína un candidato ideal para tal estudio. Es esencial para la división; interacciona consigo misma y con PBP3, la proteína necesaria para la septación que une penicilina; contiene un posible sitio de unión de ATP (Bork, et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7290-7294). Para confirmar las predicciones del modelo hemos introducido mutaciones en lugares seleccionados y estamos analizando las actividades bioquímicas de FtsA para comprobar si existen en ella las actividades predichas. □

We would like to obtain promoter up mutations, because this would be relevant for the potential applications of the project. As a further result we will obtain a functional map of one gearbox. The expression of ftsZ, one essential division gene, has been studied and found to be cyclic relative to the cell division cycle.

Cell division proteins offer the possibility to define new targets susceptible to be inhibited by new chemotherapeutics. A problem that hinders this promising line of research is our lack of knowledge on their biochemical function. We are currently trying to define functional domains within the FtsA protein. This protein is a choice candidate for this study for several reasons. It is essential for division; interacts with itself and with PBP3, the penicillin-binding protein required for septation; contains a putative ATP-binding site; and belongs to the family of the eukaryotic actin (Bork, et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7290-7294). The map position of several ftsA alleles is known. We have already introduced mutations at selected sites to confirm the predictions of the model. Biochemical analysis of FtsA is under way to test if its predicted activities are found in the protein. □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- CAM, Programa de Nuevas Tecnologías C170/90.
- DGICYT, PB89-30.
- Contrato con la empresa HISPANAGAR, SA

Científicos Visitantes Visiting Scientists

- Prof. Hermann Bujard. ZMBH.Universität Heidelberg. Alemania.
- Prof. Vladimir G.Debabov y Dr. Alexander S. Mironov. Laboratory of Bacterial Genetics. Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms. Moscow. Rusia.
- Prof. Roberto Kolter. Harvard Medical School. Dept of Microbiology and Molecular Genetics. Boston, Massachusetts. USA.
- Dr. Eugenia Paton. Institute of Molecular Biology and Genetics Ukrainian SSR Academy of Sciences. Kiev . Ucrania.
- Prof. Lawrence Rothfield. Department of Microbiology. School of Medicine. University of Connecticut Health Center. Farmington, Connecticut. USA
- Prof. Moselio Schaechter. Dept. of Molecular Biology and Microbiology. Tufts University Medical School. Boston, Massachusetts USA.

Publicaciones Publications

- Vicente, M., Palacios, P., Dopazo, A., Garrido, T., Pla, J. and Aldea, M.: On the chronology and topography of bacterial cell division. *Res. Microbiol.* 142: 253-258, 1991.
- Pla, J., Sánchez, M., Palacios, P., Vicente, M. and Aldea, M.: Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia coli* septation. *Mol. Microbiol.* 5: 1681-1686, 1991.
- Vicente, M.: Toy or tool? The use of *Escherichia coli* as a model in cell biology. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 449-451, 1991.
- Vicente, M., Kushner, S.R., Garrido, T. and Aldea, M.: The role of the 'gearbox' in the transcription of essential genes. *Mol. Microbiol.* 5: 2085-2091, 1991.
- Dopazo, A., Palacios, P., Sánchez, M., Pla, J. and Vicente, M.: An amino-proximal domain required for the localization of FtsQ in the cytoplasmic membrane, and for its biological function in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6: 715-722, 1992.
- Cañas, L.A., Avila, J., Vicente, M. and Benbadis, A.: Micropropagation of the olive tree (*Olea europaea* L.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. (Ed.) Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. 18: 493-505, 1992.

Genética Bacteriana

Bacterial Genetics

Rubens López García (Jefe de grupo)
(Group leader) Personal Científico
Tenured Scientists

Pedro A. García González
Ernesto García López
José Luis García López
Concepción Ronda Laín

Estrella Cortés Rubio Postdoctorales
Christlan Croux (Hasta X-1991) Postdoctoral Fellows

Carlos Arrecubieta Larrañaga Predoctorales
Eduardo Díaz Fernández (Hasta I-1992) Graduate Students

A. Carmen Martín Rodríguez
M^a Auxiliadora Prieto Jiménez
A. Isabel Rodríguez Sánchez-Beato
Alicia Romero Lorca (Hasta X-1991)
Jesús Miguel Sanz Morales (Hasta I-1992)

Eloísa Cano Congosto Personal Técnico
Manuel Carrasco Fernández Technical Staff
Remedios Galán Iglesias



Biología Molecular de las enzimas líticas de *Streptococcus pneumoniae* y *Clostridium acetobutylicum* y de sus bacteriófagos.

En el presente proyecto se pretende avanzar en nuestro conocimiento sobre la organización estructural de las enzimas autolíticas de *Streptococcus pneumoniae* y de las lisozimas codificadas por sus bacteriófagos. Mediante técnicas de mutagénesis dirigida se estudiará la participación de determinados aminoácidos en el centro activo de estas enzimas, localizando en el módulo N-terminal, así como la influencia de los "motivos" repetidos, identificados en el módulo C-terminal, en el reconocimiento específico del sustrato. En

Molecular biology of the lytic enzymes of Streptococcus pneumoniae and Clostridium acetobutylicum and its bacteriophages.

The aims of this project are to gain new knowledge on the structural organization of the autolytic enzymes of Streptococcus pneumoniae as well as on the lysozymes encoded by its bacteriophages. We shall study the role of certain amino acids in the active center of these enzymes, previously localized in the N-terminal domain of the molecule, by using site-directed mutagenesis, and, on the other hand, the influence of the

esta línea de investigación se sitúa, asimismo, nuestra idea de estudiar otros sistemas bacterianos como *Clostridium* donde se han identificado enzimas autolíticas que comparten con las de neumococo su dependencia de colina para su actividad. El análisis global de sus secuencias nucleotídicas proporcionará importantes datos bioquímicos y la construcción de enzimas quiméricas inter e intraespecíficas en base a estos datos ampliará nuestros resultados sobre organización modular de las proteínas y sus implicaciones filogenéticas. Por otra parte, se estudiarán dos familias de fagos que poseen proteína unida covalentemente a sus DNAs. Por último, haciendo uso de las peculiares propiedades del dominio C-terminal de la amidasa de neumococo, se desarrollarán vectores de clonación para conseguir la producción de proteínas de interés biotecnológico.

Bases moleculares de la patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae*: Profilaxis, diagnóstico y antibioterapia.

El objeto del presente proyecto es estudiar diversos aspectos de la patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae* como base para el desarrollo de medidas adecuadas tanto profilácticas como terapéuticas. En concreto se estudiarán los genes implicados en la biosíntesis de la cápsula de neumococo mediante técnicas de Biología Molecular. Por otra parte, se pretende desarrollar métodos diagnósticos fiables para la identificación en clínica de estirpes atípicas de neumococo mediante la elucidación del mecanismo de la sensibilidad a la optoquina característico de neumococo.

Biología molecular de las autolisinas de *Clostridium acetobutylicum* y su influencia en la producción de solventes.

El objetivo principal de este proyecto, finan-

repetitive motives found in the C-terminal domain on substrate recognition, will be investigated. The study of the autolytic enzymes of Clostridium acetobutylicum, where choline-dependent activities on the cell wall have been already identified, will also contribute to develop our current investigations. In addition, we shall carry out an investigation on two families of pneumococcal phages that contain protein covalently linked to the 5' ends of their DNAs. Finally, taking advantage of the peculiar properties of the C-terminal domain of the pneumococcal amidase, we shall construct vector plasmids to clone and produce proteins of biotechnological interest.

Molecular bases of the virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Prophylaxis, diagnosis and antibiotic therapy.

Our project aims to investigate several aspects of the virulence of Streptococcus pneumoniae in order to establish adequate prophylactic and/or antibiotic treatments. We will study the genetics of capsular polysaccharide biosynthesis (the main virulence factor of pneumococci). On the other hand, the gene(s) responsible of the classical optochin sensitivity of S. pneumoniae will be cloned and sequenced.

Molecular biology of autolysins from *Clostridium acetobutylicum* and their influence on solvent production.

The main aim of this project, supported by the Fundación Ramón Areces, is to increase the solvent production in

ciado por la Fundación Ramón Areces, es desarrollar métodos para mejorar la producción de solventes orgánicos en la fermentación de *C. acetobutylicum*. En este sentido se estudiará mediante el empleo de las técnicas de ingeniería genética la influencia de las autolisinas de esta bacteria en el proceso de fermentación. Para ello se pretende clonar y secuenciar los genes que codifican para estas autolisinas con objeto de poder controlar la expresión de los mismos. Dado que existen distintas cepas de *C. acetobutylicum* y en algunas de ellas se ha podido demostrar que sus autolisinas son dependientes de colina para su actividad, se estudiará la influencia de este compuesto en la fermentación. Como consecuencia de todos estos estudios se conseguirá en definitiva poner a punto las técnicas de manipulación genética de *C. acetobutylicum*, especie ésta que puede ser considerada como un posible modelo para el desarrollo de la Biología Molecular en bacterias anaerobias.

Biotransformaciones de antibióticos betalactámicos.

El objetivo de este proyecto Concertado (CDTI-CSIC-Antibióticos) es estudiar mediante el empleo de las técnicas de ingeniería genética la posibilidad de alterar la especificidad de sustrato de las enzimas denominadas penicilina- y glutaril-acilasas. Haciendo uso de diferentes procedimientos de mutagénesis y selección también se intentará que puedan reconocer como sustratos algunas penicilinas naturales que se encuentran presentes en los caldos de producción de penicilina G para mejorar el rendimiento del proceso de obtención de 6-APA. Además se intentará clonar y secuenciar los genes de otras acilasas que puedan ser útiles para la síntesis enzimática de antibióticos betalactámicos. □

the fermentation of C. acetobutylicum. In this sense, we will study the influence of the bacterial autolysins on the process using genetic engineering techniques. We will clone and sequence the genes encoding these autolysins as a direct approach to control the expression of these genes. Since some C. acetobutylicum strains contain choline-dependent autolysins we will study the influence of this aminoalcohol on the fermentation. This project will also allow us to develop many techniques useful for the genetic manipulation of C. acetobutylicum which can be considered as a model system to study the molecular biology of anaerobic bacteria.

Biotransformation of betalactam antibiotics

The aim of this Concerted project (CDTI-CSIC-Antibióticos) is to study the possibility of altering the substrate specificity of the enzymes named penicillins and glutaryl acylases by using genetic engineering techniques. To increase the production of 6-APA from penicillin G, we will also try to obtain new modified acylases able to hydrolyze the natural penicillins that are present in the cultures from which penicillin G is purified. In addition, we shall attempt to clone and sequence new acylase genes that could be useful to carry out the enzymatic synthesis of betalactam antibiotics. □

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- CICYT, PB 87-0214 (1988-1991)
- DGICYT, PB 90-0069 (1992-1994)
- CICYT, SAL91-0898-C02-01 (1992-1994)
- Fundación Ramón Areces (1991-1992)
- Proyecto Concertado (CDTI-CSIC-Antibióticos) (1992-1993)

Publicaciones

Publications

- Díaz, E., López, R., and García, J.L.: Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J. Biol. Chem.* 266, 5464-5471, 1991.
- Ronda, C., García J.L., and López, R.: Teichoic acid choline esterase, a novel hydrolytic activity in *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 80, 289-294, 1991.
- Croux, C., and García, J.L.: Sequence of the *lyt* gene encoding the autolytic lysozyme of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824: comparison with other lytic enzymes. *Gene* 101, 25-31, 1991.
- Jarvis, A.W., Fitzgerald, G.F., Mata, M., Mercenier, A., Neve, H., Powell, I.B., Ronda, C., Saxell, M., and Teuber, M.: Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology* 32, 2-9, 1991.
- Romero, A., and García, P.: Initiation of translation at AUC, AUA, and AUU codons in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 84: 325-330, 1991.
- López, R. García, E., García, J. L., Díaz, E., Romero, A., Sanz, J. M., Sánchez-Puelles, J.M., García, P., and Ronda, C.: Lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: A model of molecular evolution. In: *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci*. (Eds.). G. Dunny, P. P. Cleary and L. Mc. Kay. pp. 77-82. American Society for Microbiology, Washington, D.C.1991.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., and García, E.: Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* 203, 153-159, 1992.
- Sanz, J.M., Díaz, E., and García, J.L.: Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal mu-rein hydroalases. *Mol. Microbiol.* 6, 921-931, 1992.
- Romero, A., López, R., and García, P.: The insertion site of the temperate phage HB-746 is located near the phage remnant in the pneumococcal host chromosome. *J. Virol.* 66, 2860-2864, 1992.
- Ortega, S., García, J.L., Zazo, M., Varela, J., Cuevas, P., and Giménez-Gallego, G.: Single-step purification on DEAE-Sepharose of recombinant polypeptides produced in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 10, 795-798, 1992.

Publicaciones (Continuación)

Publications (Continued)

- García, E., García, P., and López, R.: Pneumococcal capsules: cloning of the gene that allowed the identification of the transforming principle. *Rev. Esp. Quimioter.* 5 (Suppl. 1), 38-43, 1992.
- Sanz, J.M., García, P., and García, J.L.: Role of Asp-9 and Glu-36 in the active site of the pneumococcal CPL1 lysozyme. *Biochemistry* 31, 8495-8499, 1992.
- Alvaro, G., Fernández-Lafuente, R., Rosell, C.M., Blanco, R.M., García-López, J.L., and Guisán, J.M.: Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. New choice as industrial enzyme. *Biotech. Lett.* 14, 285-290, 1992.
- Croux, C., and García, J.L.: Reconstruction and expression of the autolytic gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 95, 13-20, 1992.
- Díaz, E., López, R., and García, J.L.: Role of the major pneumococcal autolysin in the atypical response of a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 174, 5508-5515, 1992.
- Díaz, E., López, R., and García, J.L.: EJ-1: a *myoviridae*, temperate bacteriophage of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 174, 5516-5525, 1992.
- López, R., García, J. L., García, E., Ronda, C., and García, P.: Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *FEMS Microbiol Lett.* 100, 439-447, 1992.
- Romero, A., Ronda, C., García, P., García, J. L., García, E., and López, R.: Temperate pneumococcal phages with protein linked to their DNA integrate in the host chromosome. *An. Real Acad. Farm.* 58, 183-190, 1992.
- López, R., García, J. L., Díaz, E., Sanz, J. M., Sánchez-Puelles, J. M., García, P., and García, E.: Searching for the evolutionary design of the pneumococcal cell wall lytic enzymes. In: *Bacterial Growth and Lysis*. (Eds.), M. A. de Pedro *et al.* pp. 253-257. Plenum Press NY, 1992.
- García P., García, E., Romero, A., Croux, C., Ronda, C., López, R., and García, J. L.: Molecular characteristics of the cell wall lytic enzymes coded by pneumococcal phages. In: *Bacterial Growth and Lysis*. (Eds.), M. A. de Pedro *et al.* pp. 261-268. Plenum Press NY, 1992.

Microbiología Aplicada

Applied Microbiology

Gonzalo Gómez Alarcón	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Wafaa Mohamed Masoud M^a Luisa Muñoz Gómez M^a Angeles de la Torre Ruiz		Predoctorales Graduate Students
Juana M^a Lorenzo Vian		Personal Técnico Technical Staff

La alteración de los materiales de construcción de la catedrales de Salamanca y Toledo. Bases científicas para su conservación y restauración. En colaboración con el Dr. Cesáreo Saiz Jiménez.

Se han estudiado en profundidad mecanismos de alteración utilizados por los hongos filamentosos para el biodeterioro de los monumentos pétreos. En ensayos de laboratorio y simulando condiciones naturales, se ha demostrado que las cepas acidogénicas solubilizan cationes minerales de los materiales rocosos y junto con los ácidos orgánicos sintetizados, forman depósitos salinos de oxalato cálcico, magnésico y férrico y de citrato cálcico. Además, estos organismos realizan un ataque selectivo de silicatos y feldspatos sobre arenisca y granito, y de calcita y dolomita sobre caliza. Estos procesos han sido examinados por espectrometría IR, rayos X, absorción atómica, HPLC y microscopía de barrido con analizador de cationes.

Algunos hongos estudiados a través de

We have studied the alteration mechanisms used by filamentous fungi for the bio-deterioration of stone monuments. Through laboratory test, and simulating natural conditions, we have proved that acidogenic fungi provoke release of cations from stone materials due to the corrosion by the excreted organic acids. The result was the formation and precipitation of organic salt deposits as calcium oxalate, magnesium oxalate and ferric oxalate, and calcium citrate. Cultures in vitro demonstrate this fungi carries a selective attack on silicates and feldspars with sandstone and granite. Limestone's reduction was in calcium and dolomite's amount. These processes were analyzed by means of infrared spectroscopy, X-ray diffraction, HPLC, scanning electron microscopy coupled with X-ray analysis, etc.

Some strains isolated were assayed to test their capacity to oxidize both iron and manganese, which fre-

sistemas enzimáticos y no enzimáticos, oxidaron Fe y Mn, cationes comunes en muchos materiales pétreos, lo que constituye un mecanismo más de alteración.

Se ha comprobado que algunos hongos acidogénicos sintetizan también ácidos fenólicos (gálico, ferúlico, vanílico, etc.), por lo que podrían llevar a cabo un efecto mineralítico a través de los quelatos formados por los fenoles y los cationes minerales solubilizados.

Ensayos *in vitro* han puesto de relieve que los hongos pueden multiplicarse a expensas de componentes celulares de autotrofos como las algas, reteniendo, además su capacidad para sintetizar ácidos orgánicos.

Influencia de los contaminantes atmosféricos en la proliferación microbiana y en el deterioro de los monumentos.

El objetivo de este proyecto es analizar la naturaleza de los componentes orgánicos que se adhieren a la superficie de los edificios y monumentos pétreos. Muchos de los contaminantes proceden de la combustión de los motores y otras actividades. Analizaremos la influencia de los contaminantes en la alteración sobre los componentes minerales y sobre los microorganismos colonizadores. El estudio físico-químico y biológico de las costas son también objetivos a alcanzar. □

quently appear in many stony materials. The cations's oxidation was induced by fungi through indirect and direct (enzymatic) mechanisms.

On the other hand, we have demonstrated that some fungi excreted phenolic acids (gallic acid, ferulic acid, vanillic acid, etc.). These fungal metabolites could have a mineralytic effect through the chelates formed by phenols and solubilized mineral cations.

We observed in some experiments that fungi can grow using the algae cellular components, and retain their capacity to synthesize organic acids (oxalic acid, gluconic acid, fumaric acid, etc.).

The aim of this project is to study the organic compounds which accumulate on the surface of building stones and monuments. A great amount of these compounds are pollutants and they got in the atmosphere because of man's activities. We will evaluate the pollutants's influence in the alteration of stone components and the microorganisms influence. Another approach will be the physico-chemical and biological analysis in the altered crusts. □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- CICYT, PAT 767, (1989-1991).
- CAM, 059/92 (1992)

**Publicaciones
Publications**

- Gómez-Alarcón, G., Figueras, M^aJ., Saiz-Jiménez, C.: Degradation of pine kraft lignin by *Coriollopsis gallica* growing on a fibre-glass support. *Wood Science Technol.* 25, 91-97, 1991.
- De la Torre, M.A., Gómez-Alarcón, G., Melgarejo, P., Saiz-Jiménez, C.: Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain. *Science Total Environ.* 107, 159-168, 1991.
- Saiz-Jiménez, C., Hermosín, B., Calvo-Ortega, J.J., Gómez-Alarcón, G.: Applications of analytical pyrolysis to the study of stony cultural properties. *J. Analyt. App. Pyrolysis* 20, 239-251, 1991.
- De la Torre, M.A., Gómez-Alarcón, G.: Ferulic acid anaerobic degradation by marsh sediment microorganisms. *Microbios* 68, 119-127, 1991.
- De la Torre, M.A., Gómez-Alarcón, G., Melgarejo, P., and Lorenzo, J.: Fungi colonization of the Salamanca cathedral sandstones. Some patterns of degradation. En: *Science, Technology and European Cultural Heritage*. N.S. Baer, C., Sabbioni, A.I., Sors. (Eds.). Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford, pp. 511-514, 1991.

Genética Molecular de *Aspergillus* Molecular Genetics of *Aspergillus*

Miguel Angel Peñalva Soto	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Margarita Orejas		Investigadora Contratada Tenure-track Scientist
José M. Fernández Cañón	(Desde XII-1991)	Postdoctorales
Emilia Gómez Pardo	(Hasta XII-1991)	Postdoctoral Fellows
Eduardo Espeso		Predoctorales
Beatriz Pérez Esteban		Graduate Students
Honorina Martínez Blanco	(1992)	Investigadora Asociada Associate Scientist
Luis García Trujillo	(Hasta II-1992)	Personal Técnico
Carlos González	(Desde III-1992)	Technical Staff
Elena Reoyo	(Desde IX-1992)	



La biosíntesis de penicilina es una ruta típica del metabolismo secundario que en microorganismos eucariotas está presente sólo en hongos filamentosos. La ruta está regulada a nivel de transcripción de los genes estructurales.

A pesar del amplio uso de las penicilinas, se sabe muy poco acerca de los mecanismos que disparan su ruta biosintética en ciertas condiciones ambientales o de desarrollo. Utilizando el gen de la isopenicilina N sintetasa de *A. nidulans* como sistema modelo, estamos investigando este problema mediante el uso de la genética molecular. Las técnicas de genética formal y de biología molecular más sofisticadas pueden utilizarse en *A. nidulans*, lo que representa una conside-

Penicillin(s) biosynthesis is a typical secondary metabolism pathway. In eukaryotic microbes, this pathway is restricted to filamentous fungi. The pathway is regulated at the transcriptional level.

*In spite of the wide therapeutical use of these compounds, very little is known about the molecular switches which trigger on antibiotic biosynthesis under certain environmental or developmental conditions. We are approaching this problem by using molecular genetics to define the basis of the transcriptional regulation of the isopenicillin N synthetase gene in *Aspergillus nidulans*, a model organism amenable to sophisti-*

rable ventaja experimental. Nuestro abordaje incluye:

(i) Definición de los circuitos reguladores responsables del control transcripcional de *IPNS* y papel de genes reguladores de alta jerarquía. Identificación de otros genes reguladores por análisis genético formal.

(ii) Análisis funcional del promotor de *IPNS* usando integración dirigida en una sola copia de plásmidos con mutaciones del promotor fusionadas a un gen reportero.

(iii) Definición de los sitios de unión de proteínas codificadas por genes reguladores de alta jerarquía (ya disponibles) por análisis de footprint *in vitro* y mutagénesis dirigida, para evaluar su función *in vivo*.

(iv) Clonación molecular del gen que codifica para una proteína que se une al promotor de *IPNS* mediante el uso de genética en reverso.

(v) Clonación de genes estructurales de actividades accesorias de la ruta biosintética. □

cated molecular biology and formal genetic analyses. Our approach involves:

(i) Definition of regulatory circuits involved in transcriptional control and the role of wide-domain regulatory genes. Formal genetics of unidentified regulatory genes.

(ii) Functional analysis of the IPNS promoter using targeted single-copy integration of constructs carrying promoter variants fused to a reporter gene.

(iii) Definition of binding sites of already available wide-domain transcriptional regulators by footprinting analysis and site-directed mutagenesis.

(iv) Molecular cloning of the gene encoding a DNA binding activity which specifically recognises the IPNS promoter.

(v) molecular cloning of genes encoding accessory activities of the penicillin pathway. □

Organismos Financiadores **Funding Agencies**

- DGICYT, PB(s) 87-0218 (1988-91)
- DGICYT, 87-0204 (1988-92)
- DGICYT, Programa Nacional de Biotecnología BIO244/88 (1989-1991)
- DGICYT, Programa Nacional de Biotecnología BIO671/91 (1992-1994)
- CEE, BRIDGE 890136, contrato CT90/169 (1990-1993)

Publicaciones

Publications

- Peñaiva, M.A., Pérez-Esteban, B., Gómez-Pardo, E., Orejas, M. and Espeso, E.: Penicillin production by *Aspergillus nidulans*: studies on the regulation of expression of the *IPNS* gene. In: "Molecular Biology of Filamentous Fungi" (Eds.) Tudzynski, P. and Stahl, U., VGH, Weinheim, FRG, 1991.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Fernández-Valverde, M., Ferrero, M.A., Moreno, M.A., Peñaiva, M.A. and Luengo, J.M.: Isolation and characterization of the acetyl-CoA synthetase from *Penicillium chrysogenum*: involvement of this enzyme in the biosynthesis of penicillins. *J. Biol. Chem.* 267: 5474-5481, 1992.
- Espeso, E. and Peñaiva, M.A.: Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *A. nidulans*. *Mol. Microbiol.* 6: 1457-1465, 1992.

Mecanismos de Resistencia Inducida en Plantas

Induced Resistance Mechanisms in Plants

Ramona Beltrá

(Jefe de Grupo)
(Group leader)

Personal Científico
Tenured Scientist

Mohamed A. F. Yacout
M^a José López López

Predoctorales
Graduate Students

Emiliana Liébana Aliende
(Hasta IX-1992)

Personal Técnico
Technical Staff

Pilar Marcilla Cavanillas

Se han estudiado los mecanismos de resistencia inducida por ácido acetilsalicílico (aspirina) y ácido poliacrílico en plantas Solanáceas, *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée y *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc, frente a dos bacterias fitopatógenas cuya expresión de patogeneidad es muy diferente, como son *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, productora de podredumbre blanda y *Agrobacterium tumefaciens* inductora de hiperplasias mediante transformación tumoral de las células de la planta huésped.

La metodología que hemos desarrollado en este proyecto se ajusta a los diferentes mecanismos de patogenicidad de ambas bacterias, así como a las desviaciones del metabolismo celular de las plantas huésped producidas por acción de los compuestos químicos. □

*We have studied the mechanisms of induced resistance by acetylsalicylic acid and polyacrylic acid on Solanaceae, *Solanum tuberosum* L., cv. Desirée and *Nicotiana tabacum* L., cv. Xanthi-nc, against two phytopathogenic bacteria, showing both a very different pathogenicity. One of these two bacteria, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* causes soft rot on potato tubers due to pectolytic enzymes. The other one, *Agrobacterium tumefaciens* induces hyperplasias by means of a tumoral transformation of the host plant cells.*

The methodology we develop in this project was adjusted to the different mechanisms of the pathogenicity of both bacteria, as well as to the deviations of the cellular metabolism of the host plants produced by the actions of the chemical compounds. □

Organismos financiadores
Funding Agencies

-AGR, 90-0790 (1991-1992)

-CAM, C169/90 (1991-1992)

Publicaciones
Publications

-López López, M. J., López M.M., Marcilla, P., Liébana, E. y Beltrá, F.: Inducción de resistencia en tubérculos de patata frente a podredumbre blanda bacteriana. *Phytoma* 46, 1-3 (1992)

Entomología. Relación Planta-Insecto. Entomology. Relationship Plant-Insect

Pedro Castañera	(Jefe de Grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientists
Carmen Gutiérrez Martín		
Ana, Mayoral Canalejas Ana Taberner Palop		Predoctorales Graduate Students
M^a Luisa Ruíz Serra		Personal Técnico Technical Staff

La necesidad de obtener cultivares resistentes a plagas y enfermedades es un problema cada vez mas acuciante en una agricultura moderna. El uso adecuado de estas variedades resistentes implica un conocimiento profundo de los mecanismos de resistencia. En este contexto, las líneas de investigación en curso son:

- Estudio del efecto de varios genotipos de cereales de invierno, con distinta concentración del ácido hidroxámico DIMBOA sobre la tasa interna de crecimiento de poblaciones de pulgones de cereales. Asimismo, se investiga la correlación entre concentración de DIMBOA y comportamiento de alimentación de los pulgones mediante la técnica de *Electrical Penetration Graph*.

- Estudio del efecto *in vitro* e *in vivo* de las fracciones monoméricas, dimericas y tetraméricas de inhibidores de α -amilasas heterologas de endosperma de trigo y cebada sobre isoenzimas de larvas de lepidópteros plaga de productos almacenados y sobre el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*).

The need of crop varieties resistant to pests and diseases is an ever-increasing problem of modern agriculture. Proper use of plant resistance relies on a through knowledge of acting mechanisms. In this context, we are working on the following lines of research.

- *Assessment of the effect of various genotypes of winter cereals, with different levels of the hydroxamic acid: DIMBOA, on the intrinsic rate of increase of cereal aphids. We are also investigating the correlation between DIMBOA concentration and aphid probing behaviour by Electrical Penetration Graph.*

- *Studie on the effect in vitro and in vivo of the monomeric, dimeric and tetrameric fractions of heterologous α -amylase inhibitors of wheat and barley endosperm towards isoenzymes of stored product pests larvae and those of colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*).*

- Determinación de la relación plaga-daño-pérdidas en el cultivo de la remolacha azucarera, debida al ataque del curculiónido, *Aubeonymus marieae-franciscae*. Se investigan aquellos aspectos de la biología y ecología de este insecto que son necesarios para el establecimiento de dicha relación y, así, poder determinar el Umbral de Daños, criterio esencial para el diseño de un programa de Lucha Integrada. □

- *Assessment of the pest-damage-loss relationship in sugar beet crops, due to a curculionid Aubeonymus marieae-franciscae. The biology and ecology of this insect pest is being investigated to establish the above mentioned relationship and therefrom the Economic Damage Threshold, which is an essential criteria to develop an Integrated Pest Management programme.* □

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- CICYT, AGR90-0909 (1991-1993)
- CEE, STD2-642 (1992-1994)
- CITYT, AGF92-0576-802-01 (1992-1994)

Publicaciones

Publications

- Castañera, P., and Gutierrez, C.: La Resistencia de plantas a insectos: su utilidad en los cultivos de cereales. *Phytochemistry* 20, 39-41, 1991.
- González Coloma, A., Cabrera, R., Castañera, P., Gutierrez, C., & Fraga, B.M.: Insecticidal activity and dispersal of *Persea indica*. *Phytochemistry* 31, 1549-1552, 1992.

Quimiorrecepción en Insectos

Chemical Communication in Insects

Robles Chillida

(Jefe de grupo)
(Group leader)

Personal Científico
Tenured Scientist

Blayo Guerra

Investigadora Asociada
Associate Scientist

Comunicación química en insectos de interés económico: Morfología funcional, relación huesped-parásito e incidencia de pesticidas.

Chemical communication by insects of economic importance: Functional morphology, host-parasite relation and incidence of pesticides.

En la comunicación química en insectos, sus equipos receptores están directamente implicados en procesos tan importantes como el apareamiento, búsqueda del alimento, oviposición, orientación en el medio, huida frente a sustancias nocivas, etc. Por esta razón, la localización, identificación, morfología y función de estas estructuras sensitivas, es de gran importancia en el esclarecimiento de la vida de relación del insecto.

Los estudios morfológicos de los quimiorreceptores, constituyen la base fundamental para la posterior aplicación de técnicas electrofisiológicas, capaces de determinar la función exacta de cada quimiorreceptor, la respuesta del mismo a distintas sustancias atrayentes o repelentes (feromonas), concentración de dichas sustancias, etc.

Asimismo, los procesos de quimiorrecepción también intervienen en la localización del hospedador, ya sea éste de naturaleza animal o vegetal. Ejemplos de esta naturaleza lo constituyen, entre otros, nuestros trabajos sobre *Cales noacki*, parásito natural de la "mosca blanca" de los cítricos (*Aleurothrixus floccosus*), y sobre *Ceratitis capitata* y *Dacus*

In the chemical communication by insects, the receptor systems are directly implicated in processes as important as mating behaviour, feeding location, oviposition, orientation in the environment, flight from nocive substances, etc. For this reason, the location, identification, morphology and function of sensitive structures, have a great importance in the elucidation on relation to the life of the insect.

The morphological studies of these structures make up the fundamental base for the subsequent application of electrophysiological techniques with a capacity to determine the precise function of each chemoreceptor, the response to different attractive or repellent substances (pheromones), concentration of above mentioned substances, etc.

*Likewise, the chemoreception processes are also related to host-finding, either animal or plant in nature. Examples of this kind are our researches about *Cales noacki*, natural parasite of "white fly" of citrus (*Aleurothrixus floccosus*), and *Ceratitis capitata* and *Dacus oleae*, plant-parasites,*

oleae, parásitos vegetales considerados como algunas de las plagas más destructivas para la agricultura.

En resumen, el desarrollo de esta línea de investigación está conduciendo en la actualidad, a una disminución en el empleo de plaguicidas con efectos contaminantes y a un mayor desarrollo de la lucha biológica. □

considerated as ones of the most destructive of insect pests in agriculture.

To sum up, the development of this research line, is getting at present, to a decrease of use of the pesticides with pollution effects and to larger development of biological fight. □

Científicos Invitados **Invited Scientists**

- Dr. Francisco Beitia Crespo, INIA, Madrid.
- Dra. Teresa del Busto de la Calle, IVIA, Valencia.
- Dr. José Amador de la Calle Pascual, Universidad de Murcia.
- Dr. Antonio Garrido Vivas, IVIA, Valencia.
- Prof. Bill S. Hansson, Department of Ecology, Lund University (Sweden).
- Prof. Lester J. Wadhams, Department of Insecticides and Fungicides, Rothamsted Experimental Station, Harpenden Herst (U.K.).
- Dr. José Malagón Cañizares, IVIA, Valencia.
- Prof. Moray Anderson, Department of Zoology and Comparative Physiology, University of Birmingham (U.K.).

Organismos Financiadores **Funding Agencies**

- CSIC, 630/099, (1991)
- CAICYT, 816 (1991-1993)

Publicaciones **Publications**

- Cascales, M., Martín-Sanz, P. D., Cremonesi, G., Napp, I., Aguilar, A., Ferrer-Corral, E. G., *modulation of the mechanism of hepatic peroxidation mechanisms in insecticides (fungicides) induced damage to liver. Journal of Invertebrate Pathology, 12 (2): 233-240, 1991.*

Biología Molecular de Plantas

Plant Molecular Biology

José J. Sánchez Serrano
(Desde V-1991)

(Jefe de grupo)
(Group leader)

Personal Científico
(Tenured Scientist)

Guy Vancanneyt,
(Desde VI-1992)

Postdoctoral
Postdoctoral Fellow

Christian Dammann
(Desde IX-1992)

Predoctorales
Graduate Student

El ácido jasmónico (JA) es una hormona vegetal que juega un papel primordial en la respuesta de las plantas frente a las heridas. JA induce, asimismo, tuberización en patata.

El inhibidor de proteinasas II (pin2) de patata está codificado en una familia génica que se expresa de manera constitutiva en los tubérculos, mientras que en la parte aérea de la planta sólo se activa al ser ésta dañada. La expresión de los genes pin2 se induce igualmente mediante tratamiento del foliaje de la planta con la hormona vegetal ácido jasmónico (JA).

En plantas transgénicas se ha demostrado que un promotor pin2 es activo constitutivamente en tubérculos y, a la vez, inducible por herida en hojas. Nuestro trabajo se encamina a determinar las secuencias que controlan en *cis* estos dos modos diferentes de expresión para, posteriormente, estudiar la interacción de estas secuencias reguladoras con proteínas nucleares de la planta.

Este proyecto tiene como objetivo, por otro lado, caracterizar mediante el estu-

Jasmonic acid (JA) is a plant growth regulator that plays a key role in the plant's response to mechanical wounding. It has also been shown to induce tuber formation in potato. Interestingly, a number of wound-induced genes are constitutively expressed in potato tubers.

The potato proteinase inhibitor II (pin2) gene family is constitutively expressed in tubers, and in the plant foliage upon mechanical wounding. The plant growth regulator jasmonic acid (JA) is able to induce pin2 expression in the foliage in the absence of any mechanical damage. The promoter region of a member of the pin2 gene family is able to drive expression of a linked reporter gene in tubers and wounded leaves of transgenic potato plants. Our work focuses on the cis-acting sequences governing this dual pin2 expression pattern. The in vitro and in vivo interactions of nuclear proteins with pin2 promoter regulatory regions will be subsequently studied.

On the other hand, this project aims to characterise the biosynthetic pathway of

dio de mutantes de *Arabidopsis* la ruta biosintética de JA, así como establecer los distintos pasos que forman la cadena de transducción de JA. Este estudio nos permitirá en un futuro modificar la ruta de biosíntesis y percepción de esta fitohormona a fin de obtener variedades transgénicas más resistentes a plagas o con mayor rendimiento en la producción de tubérculos en el caso de patata. □

JA, and to elucidate the JA signal transduction pathway by isolating Arabidopsis JA-insensitive and under-producing mutants. A long-term goal is to manipulate JA synthesis and perception to obtain transgenic plant varieties with improved agronomical traits such as enhanced resistance to predators, and higher tuber yield in potato. □

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- CAM, C070/91, Programa de Agroalimentación (1991-1994)
- CICYT, Acción Especial, BIO92-1069-E (1992)
- CICYT, BIO92-0224 (1992-1993)
- CAM 269/92, Programa de Agroalimentación (1992-1995)

Publicaciones

Publications

- Peña-Cortés, H., Willmitzer, L. and Sánchez-Serrano, J. J.: Abscisic acid mediates wound induction but not developmental-specific expression of the proteinase inhibitor II gene family. *Plant Cell*, 3, 963-972, 1991.
- Sánchez-Serrano, J.J., Amati, S., Ebner, M., Hildmann, T., Mertens, R., Peña-Cortés, H., Prat, S. and Willmitzer, L.: The involvement of abscisic acid in wound responses of plants. In: *The Physiology and Biochemistry of ABA*. (Eds.) W. J. Davies and H. G. Jones. "Topics in Environmental Plant Physiology". BIOS Scientific Publishers Limited. Society for Experimental Biology. pp. 201-216, 1991.
- Peña-Cortés, H., Xiangjun, L., Sánchez-Serrano, J. J., Schmid, R. and Willmitzer, L.: Factors affecting gene expression of patatin and proteinase-inhibitor-II gene families in detached potato leaves: Implications for their co-expression in developing tubers. *Planta* 186, 495-502, 1992.
- Lorberth, R., Dammann, C., Ebner, M., Amati, S. and Sánchez-Serrano, J. J.: Promoter elements involved in environmental and developmental control of potato proteinase inhibitor II expression. *The Plant J*, 2, 477-486, 1992.
- Hildmann, T., Ebner, M., Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J.J., Willmitzer, L. and Prat, S.: General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4, 1157-1170, 1992.

Biología Molecular de la Resistencia Vegetal

Molecular Biology of the Plant Resistance

Carmen Castresana Fernández	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico (Tenured Scientist)
Elena Alonso Bárcenas		Postdoctoral (Postdoctoral Fellow)
Patricia Obregón Calderón		Predoctoral (Graduate Student)
Emiliana Liébana Alfende (Desde IX-1992)		Personal Técnico (Technical Staff)
Juan Ignacio Moreno Mozo		

Nuestro interés se centra en el estudio de los procesos celulares que ocurren en la planta en respuesta a la presencia de patógenos y que conducen a la manifestación de la reacción de defensa vegetal. Para ello hemos concentrado nuestra atención en el análisis de los mecanismos de regulación que controlan la expresión de la familia de genes que codifican los enzimas hidrolíticos con actividad β -1,3-glucanasa en plantas de tabaco. Dichos enzimas pertenecen al grupo de proteínas "PR" o *pathogenesis-related proteins* cuya presencia en la planta se induce durante la reacción hipersensible o reacción de defensa vegetal a través del aumento en los niveles de transcripción de los genes correspondientes. Con este proyecto nos proponemos identificar los elementos reguladores que actúan en *cis* y *trans* controlando la expresión de los genes β -1,3-glucanasa caracterizados. Igualmente, y mediante fusión de los promotores estudiados a genes marcadores, nos proponemos obtener plantas mutantes de *Arabidopsis* en las que por efecto de la mutación se hayan

*Our interest concerns the study of the plant cellular processes which take place in response to pathogen infection and lead to the plant defense reaction. To achieve this goal we will analyze the regulatory mechanisms controlling the expression of a family of genes encoding hydrolytic enzymes with β -1,3-glucanase activity in tobacco plants. These enzymes have been shown to be part of a larger group of proteins known as "Pathogenesis-related" (PR) proteins whose induction in plants is commonly associated with the establishment of an incompatible interaction. We propose to identify the cis and trans regulatory elements involved in the induction of gene expression during the plant defense reaction. In addition, the regulatory sequences identified will be fused to selectable and reporter genes and introduced in *Arabidopsis thaliana* plants. Mutants of the transgenic *Arabidopsis* will be*

modificado las características de expresión conferidas por dichos promotores. De esta forma comenzaremos a identificar aquellos productos vegetales que intervienen en la ruta de transducción que conduce a la inducción de la reacción de defensa vegetal.

Aparte de sus propios mecanismos de defensa, los niveles de resistencia vegetal frente a infecciones por hongos fitopatógenos se han mejorado de forma indirecta, mediante adición al suelo de ciertos microorganismos con actividad antifúngica. Tal es el caso de diversas especies del género *Trichoderma*, utilizadas como agentes antifúngicos debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos *in vivo*. Aunque se desconoce su mecanismo de acción, se ha comprobado que *Trichoderma* produce enzimas hidrolíticas tales como β -1,3-glucanasas y quitinasas que podrían ser, al menos parcialmente, responsables de su actividad antifúngica. La presencia en plantas de enzimas similares, β -1,3-glucanasas y quitinasas, potencialmente involucrados en la defensa vegetal, (debido a su actuación como inhibidores del crecimiento de hongos patógenos *in vitro*), sugiere que dichos enzimas poseen un papel relevante en la prevención del crecimiento fúngico en ambos organismos. Por ello, y con objeto de desarrollar estrategias alternativas de protección vegetal, nos proponemos mejorar tanto los niveles de resistencia de la planta, como la actividad antifúngica de *Trichoderma*, mediante modificación, en ambos organismos, de la producción cualitativa y cuantitativa de los enzimas hidrolíticos mencionados. Mediante inserción en el genoma vegetal de los genes correspondientes de *Trichoderma* y viceversa, proveeremos a los organismos transgénicos seleccionados de nuevas características enzimáticas que podrían enriquecer su espectro antifúngico. □

obtained in which the expression patterns conferred by the promoters utilized will be modified. In these manner we will start to analyze the plant genes whose encoded products participate in the transduction pathway activated in response to microbial attack.

Besides their own defense mechanisms, plant resistance to fungal infection, has been indirectly improved by addition to the soil of certain microorganisms with potential antifungal activity. Such is the case of Trichoderma spp., a mycoparasitic fungi used for many years as biocontrolling agent for the protection of different crops against fungal infection. Hydrolytic enzymes involved in the degradation of the fungal cell wall have been found both in plants and Trichoderma spp. This observation suggests that those enzymes could play a major role in preventing fungal growth in their corresponding systems. The present project is concerned with the development of novel strategies to control plant diseases caused by fungi. The level of plant resistance, as well as the biocontrolling ability of Trichoderma spp. will be improved by using genetic engineering techniques to modify the production of hydrolytic enzymes both qualitatively and quantitatively. Insertion of Trichoderma genes in the plant genome and viceversa will provide to the transgenic organisms with new isoforms whose specific activity could differ from the endogenous ones enriching in this manner their antifungal spectrum. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- CEE, PVD, CE.-CI1*-0889 SSMA, (1991-1993).
- DGICYT, PB90-0131; CM C070/91, (1991-1993).
- CEE, STD3 , CE.-TS3*-CT92-0140, (1992-1995).

Publicaciones
Publications

- Alonso, E., García-Luque, I., de la Cruz, A., Wicke, B., Avila-Rincón, M.J., Serra, M.T., Castresana, C., and Diaz-Rufz, J.R. Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *J. Gen. Virol.*, 72, 2875-2884. 1991.
- De Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., Van Montagu, M., Inze, D., and Castresana, C. Suppression of β -1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J.*, 11, 2595-2602. 1992.

Virología Vegetal

Plant Virology

José Ramón Díaz Ruíz (Jefe de grupo) Personal Científico
(Group leader) Tenured Scientists

Isabel García Luque
Dionisio López Abella
M^a Teresa Serra Yoldi

Carmen Ferreiro Esteban
Laura Gil Alberdi
Leandro Peña García

Postdoctorales
Postdoctoral Fellows

Tomás Canto Ceballos
Juan José López Moya
Ana I. Sanz Mollnero
Francisco Tenllado Peraio
Jose M^a Tostado Alvarez
Jumana Trad Yunes
Carmen Vaquero Martín

Predoctorales
Graduate students

M^a Ascensión González Díaz
Montserrat Llorente de Mingo
Adela Martín de Saavedra
Sacramento Peñalver Espino

Personal Técnico
Technical Staff



Nuestra línea de trabajo está enfocada hacia el control biológico de enfermedades virales en plantas de interés agrícola, mediante (i): la identificación y caracterización de virus de importancia económica para la Agricultura española, y el análisis de resistencias naturales (ii): el conocimiento molecular de los procesos de replicación, patogénesis y transmisión de algunos virus vegetales (iii): la obtención de resistencias artificiales mediante la inserción en el genoma de plantas de secuencias virales capaces de interferir con la replicación viral. □

Our research line is focused towards the biological control of viral diseases in agriculturally important crops through (i): the identification and characterization of viruses which cause diseases in economically important crops in Spain, and the analysis of natural resistances (ii): the understanding of the molecular mechanisms underlying the replication, pathogenesis, and transmission of certain plant viruses and (iii): the attainment of artificial resistances through the introduction into the plants genome of virus-related sequences capable of interfering with viral replication. □

Científicos Invitados
Invited Scientists

-Dr. K. Ostrowska. Instituto de Genética de Plantas de la Academia de Ciencias de Polonia, 1991.

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- PLANICYT, AGR88-0082 (1989-1992)
- CICYT, AGR91-0432 (1991-1994)
- CEE, BIOT-CT90-0156 (SMA) (1990-1993)
- CDTI-EMPRESA, WESTERN-SEED ESPAÑA SA. Proyecto Concertado nº 92104 (1992-1993)
- Comisión Mixta Hispano-Húngara, CSIC/Plant Protection Inst., Academia de Ciencias Húngara, Budapest, (1991-1993)

Publicaciones
Publications

- Avila, A.C., Peña, L., Kitajima, E.W., Resende, R., Díaz Múgica, M.V., Díaz Ruiz, J.R., and Peters, D.: Characterization of a tomato spotted wilt virus (TSWV) isolated from *Capsicum annuum* L. in the Canary Islands. *Phytopathol. Medit.* 30, 23-28, 1991.
- Alonso, E., García-Luque, I., de la Cruz, A., Wicke, B., Avila-Rincón, M.J., Serra, M.T., Castresana, C., and Díaz-Ruiz, J.R.: Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *J. Gen. Virol.* 72, 2875-2884, 1991.
- Tostado, J.M., Alonso, E., García-Luque, I., Díaz-Ruiz, J.R. y Serra, M.T.: Transformación de *Nicotiana clevelandii* Gray con el gen de la proteína de cubierta del virus del moteado suave del pimiento (PMMV). Eds.: G. Nicolás y B. Sabater. *Ediciones Universidad de Salamanca*. págs. 49-56, 1991. ESPAÑA.
- López-Moya, J.J., Cubero, J., López-Abella, D., and Díaz-Ruiz, J.R.: Detection of cauliflower mosaic virus (CaMV) in single aphids by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Meth.* 37, 129-138, 1992.
- Arzuza, O., Urzainqui, A., Díaz-Ruiz, J.R., and Taberés, E.: Morphogenesis of African swine fever virus in monkey kidney cells after reversible inhibition of replication by cycloheximide. *Arch. Virol.* 124, 343-354, 1992.

Biología Celular y Molecular Vegetal

Cellular and Molecular Plant Biology

M^a Encarnación Fernández Gómez	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientists
Fco. Javier Medina Díaz Susana Moreno Díaz de la Espina		
Marta Martín Basanta		Postdoctoral Postdoctoral Fellow
M^a Angeles Cerezueta Rosique (Hasta III/91)		Predoctorales Graduate Students
Antonio Cerdido Ancel Paloma Herguido Herguido M^a Asunción Medina Díaz Ana Mínguez Garrido		
Oiga Echeverría Susana Franca Gerardo Vázquez-Nih		Investigadores Asociados Associate Scientists
Nieves Fonturbel Cabañas Mercedes Camota Romero		Personal Técnico Technical Staff

Matriz nuclear y nucleoesqueleto de plantas superiores. Caracterización de los polipéptidos mayoritarios del nucleoesqueleto y los tres dominios de la matriz nuclear de plantas mediante extracción diferencial, electroforesis bidimensional e inmunoblotting con anticuerpos contra proteínas estructurales de la matriz o asociadas a ella (laminas, matrinas, topoisomerasas I y II, proteínas de los SnRNPs, hnRNPs y nucleolina). Nuestros estudios han demostrado la existencia de laminas en plantas, que están relacionadas inmunológicamente con los subtipos descritos en vertebrados y que forman una lámina bien orga-

Nuclear matrix and nucleoskeleton in higher plants. Characterization of the major polypeptides in nucleoskeleton and in the three domains of the plant nuclear matrix by differential extraction, bidimensional SDS-PAGE and immunoblotting with antibodies against structural proteins of the matrix or matrix-bound proteins (lamins, matrins, topoisomerases I and II, proteins of the SnRNPs, HnRNPs and nucleolin). Our studies demonstrate the existence of lamins in plants, immunologically related with the subtypes described in vertebrates which form a well organized lamina, confirming that these proteins are very

nizada, confirmando que estas proteínas son miembros muy antiguos de la familia de los FI, esenciales para la organización topológica de los dominios de DNA, y que se han conservado en plantas durante la evolución mejor que los FI citoplásmicos.

Organización y funcionamiento nuclear en dinoflagelados. Los Dinoflagelados son un grupo eucariota muy primitivo, con características nucleares de tipo procariota como la falta de nucleosomas e histonas junto a otras claramente eucariotas y que se consideran una línea evolutiva independiente de la eucariota actual. El proyecto se centra en la caracterización de los complejos ribonucleoproteicos de transcripción y *splicing* mediante anticuerpos contra diferentes componentes de los mismos y la determinación de las proteínas reconocidas en Dinoflagelados, y en el aislamiento de la matriz nuclear y análisis de su composición primaria, organización y relación con el citoesqueleto. Nuestros estudios han revelado la existencia de una MN de tipo eucariota en Dinoflagelados, demostrando que esta estructura es una adquisición antigua del núcleo eucariota previa o en todo caso independiente a la de histonas y nucleosomas.

Análisis y conservación de recursos genéticos vegetales. En un proyecto de conservación de especies autóctonas de México, se ha trabajado con una especie de interés comercial (*Lycopersicon sculentum*) en la que hemos demostrado por primera vez el *splicing* cotranscripcional en plantas. Actualmente se trabaja preferentemente

old members of the intermediate filament family of proteins, which are essential for the topological organization of DNA domains, and that have been conserved in plants during evolution better than their cytoplasmic IF-counter parts.

Nuclear organization and functioning in Dinoflagellates. *Dinoflagellates form a group of very old primitive eukaryotes, which present some features of procaryotes as are the lack of histones and nucleosomes with other features clearly eukaryotes, and which are considered to be an evolutive branch independent of the actual eukaryotes. The project focusses on the characterization of the ribonucleoproteic transcription and splicing complexes by using antibodies against some of their components and the determination of the proteins recognized in Dinoflagellates, and also the isolation of the nuclear matrix and analysis of its protein composition, macromolecular organization and relation with the cytoskeleton. Our studies have demonstrated the presence of an eukaryotic nuclear matrix in Dinoflagellates, revealing that this structure is an old acquisition of the eukaryotic nuclei previous or at least independent of that of histones and nucleosomes.*

Analysis and conservation of plant genetic resources. *In a project of conservation of autoctonous species of Mexico, we have studied a specie of commercial interest (Lycopersicon sculentum) in which we demonstrated for the first time the cotranscriptional splicing in plants. Now the work preferentially centres in a wild specie of the*

en una especie de selva tropical recientemente descubierta (*Lacandonia schismatica*) que constituye una discontinuidad macroevolutiva por la disposición de sus órganos reproductores, que podría estar relacionada con una alteración de genes homeóticos. En el CIB se efectúa el análisis de la conservación de proteínas nucleares en *L. schismatica* y otras especies americanas próximas en relación con otras monocotiledóneas.

Biogénesis de los ribosomas. Se estudia un proceso clave en la vida de todas las células, el cual se expresa morfológicamente como un orgánulo nuclear prominente y ubicuo en células eucarióticas: el nucléolo. Se abordan dos cuestiones fundamentales:

1) Conocer las etapas esenciales de este proceso, filogenéticamente conservadas. Para ello se ha elegido una proteína nucleolar multifuncional: la **nucleolina**, que juega un papel central en la regulación del proceso a distintos niveles. La purificación, secuenciación, fosforilación y endoproteólisis de esta proteína en células vegetales permite conocer qué dominios moleculares de la proteína están asociados a funciones esenciales al proceso, y qué otros son específicos de las células vegetales.

2) Establecer la **arquitectura molecular** del nucléolo, definiendo en él dominios ultraestructurales asociados a etapas precisas de la síntesis y procesamiento del RNA ribosómico, mediante la aplicación de técnicas de Biología Molecular a nivel ultraestructural, y el uso de núcleos aislados y métodos pre-inclusión para la detección de proteínas y ácidos nucleicos.

*tropical forest recently discovered (*Lacandonia schismatica*) which constitutes a macroevolutive discontinuity because of the disposition of its reproductive organs, which could be related with an alteration in homeotic genes. We are carrying out the analysis of the conservation of nuclear proteins in *Lacandonia* and other american related species in relation with other monocotyledoneous.*

Ribosome biogenesis. A key process in the life of all cells is being studied. It is morphologically expressed as a prominent nuclear organelle, ubiquitous in eucaryotic cells: the nucleolus. Two fundamental questions are approached:

1) To know the essential steps of this process, which are phylogenetically conserved. For this purpose, a multifunctional nucleolar protein has been chosen: **nucleolin**, which plays a central role in regulating the process at multiple levels. The purification, sequencing, phosphorylation, and endoproteolysis of this protein in plant cells allow the identification of those molecular domains which are associated with essential functions in the process, as well as of those domains specific for plant cells.

2) To establish the **molecular architecture** of the nucleolus, by means of the definition of nucleolar ultrastructural domains associated with the distinct steps of ribosomal RNA synthesis and processing, by means of the application of Molecular Biology techniques at the ultrastructural level, and the use of isolated nuclei and pre-embedding methods for detection of proteins and nucleic acids.

Microondas en biología espacial.

Se desarrollan nuevos métodos de preservación estructural del material biológico vegetal mediante microondas. El objetivo final es posibilitar la realización de estas técnicas en un laboratorio espacial. Además, se persigue mejorar el compromiso preservación estructural-retención de la antigenicidad incluso en su utilización convencional, en la Tierra. □

Microwaves in space biology. *New methods are being developed for the structural preservation of plant biological material by means of microwaves. The final goal is to make possible the realization of these techniques in a space laboratory. Furthermore, an improvement is hoped to be obtained in the compromise of structural preservation-retention of antigenicity, even in their conventional use, in the Earth.* □

Organismos Financiadores Funding Agencies

- DGICYT, PB88-0037 (1989-1992)
- European Space Agency (ESA), Subcontrato DO 00510065 A05144, del Contrato ESTEC/9127/90/NL/PB(SC) (1991-1992)
- Convenio Cooperación Científica, CSIC/JNICT de Portugal (1992)
- Convenio CSIC/CONACYT (1987-1992)

Trabajos de Divulgación Press Articles

- Medina, F.J.: La Nueva Biología, ¿una amenaza para la Fe?. *Beresit*. II: 163-17, 1991.
- Marco R., and Medina, F.J.: Panorama científico de la Biología Celular actual. *Política Científica* 34: 50-54, 1992.

Publicaciones Publications

- Martin M., and Medina, F.J.: A *Drosophila* anti-RNA polymerase II antibody recognizes a plant nucleolar antigen, RNA polymerase I, which is mostly localized in fibrillar centres. *J. Cell Sci.* 100, 99-107, 1991.
- Moreno Díaz de la Espina, S., Barthelémy, I., and Cerezueta M.A.: Isolation and ultrastructural characterization of the residual nuclear matrix in a plant cell system. *Chromosoma* 100, 110-117, 1991

Publicaciones (Continuación)

Publications (Continued)

- Moreno Díaz de la Espina, S., Mínguez, A., Vázquez-Nin, G.H., and Echeverría, O.M.: Fine structural organization of a non reticulate plant cell nucleus: ultracytochemical and immunocytochemical study. *Chromosoma* 101, 311-321, 1992.
- Martín, M., García-Fernández, L.F., Moreno Díaz de la Espina, S., Noailles-Depeyre, J., Gas N., and Medina, F.J.: Identification and localization of a nucleolin homologue in onion nucleoli. *Exp. Cell Res.* 199, 74-84, 1992.
- Martín, M., Moreno Díaz de la Espina, S., Jiménez García, L.F., Fernández Gómez, M.E., Medina, F.J.: Further investigations on the functional role of two nuclear bodies in onion cells. *Protoplasma* 167, 175-182, 1992.
- Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Mínguez, A., Moreno Díaz de la Espina, S., Fakan, S., and Martín, T.E.: Ribonucleoprotein components of root meristematic cell nuclei of the tomato, characterized by application of mild loosening and immunocytochemistry. *Exp. Cell Res.* 200, 431-438, 1992.
- Medina, F.J., and Moreno Díaz de la Espina, S.: On Intranucleolar chromatin and Fibrillar centres in Higher Plants. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1235-1236, 1992.

Bioquímica de Hongos

Biochemistry of Fungi

Concepción García Mendoza Monique Novae-Ledieu	(Jefes de Grupo) (Group leaders)	Personal Científico Tenured Scientists
Manuel Valmaseda Jadu		Postdoctoral Postdoctoral Fellow
Susana Alonso del Arco		Predoctorales Graduate Students
Myriam Calonge Macaya (Desde XI-1992)		
Victor Muez Elustondo		
Amelia Pérez Cabo		Investigadora Asociada Associate Scientist
Antonia Conde Viced M^a Angeles Corrales		Personal Técnico Technical Staff

Los basidiomicetos superiores cultivados para el consumo humano constituyen un grupo de hongos que en la actualidad son objeto de estudio, tanto para su mejora genética como para la caracterización de cepas salvajes e híbridas para su posterior protección legal y poder así evitar su explotación incontrolada.

Agaricus bisporus o champiñón común, a causa de su excepcional ciclo biológico produciendo esporas binucleadas, requiere imprescindiblemente la obtención de protoplastos y posterior reversión para poder separar artificialmente los homocariotes (ya que no son formas nativas) con objeto de obtener híbridos de cruce por anastomosis de micelios homocarióticos compatibles. Paralelamente esta técnica de obtención

Higher basidiomycetes, cultivated for human nutrition, constitute a fungal group which, at the present time, is the object of study not only for their genetics improvement but also for the characterization of wild and hybrid strains for further legal protection and to avoid their uncontrolled exploitation.

Agaricus bisporus or common mushroom, because of its unusual biological cycle which produces binucleate spores, requires absolute protoplast production and further reversion to isolate the homokaryons (which are not native forms), and obtain cross breeding hybrids by anastomosis of compatible homokaryons. In parallel this protoplast production

y reversión de protoplastos es la base de la hibridación somática o fusión de protoplastos

Tanto las cepas salvajes como las híbridas tienen que estar debidamente caracterizadas con objeto de su posterior control, para lo cual se requiere el estudio de diversos marcadores bioquímicos y genéticos. La estructura de ciertos polisacáridos de la pared ha mostrado gran utilidad en la discriminación de cepas salvajes. El análisis de los patrones de isoenzimas igualmente ha mostrado claras diferencias entre cepas salvajes, homocariotes e híbridos. El estudio de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción (RFLP's) confirma la caracterización de homocariotes. □

and reversion technique is also the basis for somatic hybridization or protoplast fusion.

Wild and hybrid strains have to be exactly characterized for their future legal control, for which it is necessary to study some biochemical and genetics markers. Certain wall polysaccharide structures have shown great utility in the wild strain discrimination. Analysis of the isozyme patterns has shown some differences between wild strains, homokaryons and hybrids. The study of restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) confirms the homokaryons characterization. □

Organismos Financiadores **Funding Agencies**

- CDTI-Industria Gurelán, Nº 900225 (1990-92)
- DGICYT, PB 910054 (1992-1993)
- Proyecto de cooperación Hispano-Francés MEC, (HF 113)

Publicaciones **Publications**

- García Mendoza, C., Pérez Cabo, A., Sánchez González, M.L., and Novaes-Ledieu, M.: Morphological and ultrastructural studies on protoplast production and reversion of the higher basidiomycete *Agaricus bisporus*. *Current Microbiol.* 22, 191-194, 1991.
- García Mendoza, C: Cell wall structure and protoplast reversion in basidiomycetes. *Trends in Microbiology (supplement 1) World J. Microbiol. Biotech.* 8, 36-38, 1992.

Carbohidratos Microbianos

Microbial Carbohydrates

Juan Antonio Leal Ojeda	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
M ^a Begoña Gómez Miranda M ^a Carmen Guerrero Benito		Postdoctorales Postdoctoral Fellows
Jazabel Domenech Manteca		Predocctoral Graduate student
Jesús López Ramírez		Personal Técnico Technical Staff

Se han extraído, purificado e identificado diferentes polisacáridos de las paredes celulares de especies de: *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*.

Hemos encontrado polisacáridos solubles en álcali y agua cuya composición y estructura, determinada por cromatografía de gases-espectroscopía de masas de los derivados permetilados y resonancia magnética nuclear, son diferentes en los distintos géneros estudiados. Estos polisacáridos pueden tener gran interés en quimiotaxonomía, permitiendo hacer grupos homogéneos, así como establecer relaciones filogenéticas entre grupos próximos. También se está investigando su actividad como inmunomoduladores.

Estos polisacáridos se están utilizando como sustratos para detectar y aislar nuevas enzimas hidrolíticas. Se ha purificado y caracterizado una galactanasa que es específica para el β -(1-5) galactofurano obtenido de las paredes de *Eupenicillium crustaceum*. □

We have extracted, purified and identified different cell wall polysaccharides from species of: *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton*.

We have found alkali-soluble and water-soluble polysaccharides whose composition and structure, determined by gas chromatography-mass spectrometry and NMR spectrometry, are different in the species investigated. These polysaccharides are of interest in chemotaxonomy allowing to group homogeneously the species and to establish phylogenetic relationships among the groups. We are also studying the production of antibodies to *Eupenicillium crustaceum* and *Talaromyces flavus*.

The polysaccharides used in this study are being utilized as substrates to detect and to isolate new hydrolytic enzymes. A galactanase specific for the β -(1-5)-galactofuran from the cell wall of *Eupenicillium crustaceum* has been isolated and purified. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

-DGICYT, PB87-243 (1988-1993)

Publicaciones
Publications

- Ramos-Sánchez, M.C., Rodríguez-Torres, A., Leal, J.A., Martín-Gil, J., and Martín-Gil, F.J.: Thermal techniques to characterize fungal polysaccharides and bacterial lipo-polysaccharides. *Biotechn. Prog.* 7, 526-533, 1991.
- Almendros, G., Leal, J.A., Martín, F., and González-Vila, F.J.: The effect of composting on the organic colloidal fraction from domestic sewage sludge. *Lect. notes Earth Sci.* 33, 205-216, 1991.
- Leal, J.A., Gómez-Miranda, B., Bernabé, M., Cano J., and Guarro, J.: The chemical composition of the wall of six species of *Aphanoascus*: The taxonomic significance of the presence of α -(1-2)(1-6) mannan and α -(1-4) glucan. *Mycol. Res.* 96, 363-368, 1992.
- Reyes, F., Alfonso, C., Martínez, M.J., Prieto, A., Santamaría F., and Leal, J.A.: Purification of a new galactanase from *Penicillium oxalicum* catalysing the hydrolysis of β -(1_5)-galactofuranose linkages. *Biochem. J.* 281, 657-660, 1992.
- Leal, J.A., Guerrero, C., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., and Bernabé, M.: Chemical and structural similarities in wall polysaccharides of some *Penicillium*, *Eupenicillium* and *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 90, 165-168, 1992.
- Buckheit, R.W.(Jr.), White, E.L., Shannon, W.M., Guerrero, A., Pivel, J.P., Carrasco, L., Leal, J.A., and Chirigos, M.A.: Significant anti-HIV activity of new modified polyanionic polymers *in vitro*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 14(4), 707-721, 1992.
- Martín-Gil, F.J., Leal, J.A., Gómez-Miranda, B., Martín Gil, J., Prieto, A., and M. Ramos-Sánchez, C.: Low temperature thermal behaviour of chitins and chitin-glucans. *Thermochim. Acta*, 211, 241-254, 1992.

Fisiología y Bioquímica de Hongos Filamentosos

Physiology and Biochemistry of Filamentous Fung

Fuensanta Reyes Ramírez	(Jefe de Grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientists
M^a Jesús Martínez Hernández		
Oscar Nuero García Javier Ruiz Dueñas		Predoctorales Graduate Students
Francisco Santamaría Pérez		Investigador Asociado Associate Scientist
Carlos Alfonso Botello Carmelina Rodríguez Muñoz		Personal Técnico Technical Staff

El estudio de la Fisiología y Bioquímica de los hongos filamentosos se ha centrado en las propias enzimas líticas excretadas al medio de cultivo durante el proceso degradativo e implicadas en la degradación de los carbohidratos que componen su pared celular. Principalmente se han estudiado los complejos enzimáticos que participan en la degradación de la quitina y los β -glucanos presentes en la pared celular de *Aspergillus nidulans* y *Penicillium oxalicum*, así como la regulación de la degradación de estos polímeros.

Como aplicación de estos trabajos estudiamos el posible control biológico de *Fusarium oxysporum* por hiperparasitismo y lisis.

Es interesante destacar el estudio de enzimas líticas, entre ellas una lipasa, obtenida de residuos industriales. □

*The study of the physiology and biochemistry of filamentous fungi is carried out about lytic enzymes excreted to the medium during the degradative process and implicated in the degradation of the carbohydrates present in its cell wall of each fungus. The first objective has been to study the enzymatic system that degrades the chitin and β -glucans in *Aspergillus nidulans* and *Penicillium oxalicum*, as well as the enzymatic regulation of these systems.*

*As applications of this work we are studying the biological control of the phytopathogenic fungus, *Fusarium oxysporum*, by hyperparasitism and lysis.*

Furthermore some lytic enzymes, principally a lipase, from industrial waste is being studied. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- Plan Nacional I+D, AGR 91-0014-C02-02 (1991-1994)
- Comunidad de Madrid, CO-52/91 (1991-1994)
- Contrato con la Industria NOREL (1992-1993)

Publicaciones
Publications

- Alfonso, C., Martínez, M.J. and Reyes, F.: Degradation of chitosan in the autolysis of Mucorales. *Mycol. Res.* 95, 217-219, 1991.
- Martínez, M.J., Alconada, M.T., Guillén, F., Vázquez, C. and Reyes, F.: Pectic activities from *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. Purification and characterization of an exopolygalacturonase. *FEMS Microbiol. Lett.* 81, 145-150, 1991.
- Reyes, F., Alfonso, C., Martínez, M.J., Prieto, A., Santamaría, F. and Leal, J.A.: Purification of a new galactanase from *Penicillium oxalicum* catalysing the hydrolysis of β -(1-5)-galactofuran linkages. *Biochem. J.* 281, 657-660, 1992.
- Alfonso, C., Martínez, M.J. and Reyes, F.: Purification and properties of two endochitosanases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation. *FEMS Microbiol. Lett.* 95, 187-194, 1992.
- Alfonso, C., Del Amo, F., Nuero O.M. and Reyes, F.: Physiological and biochemical studies on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 for its biocontrol by unpathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 99, 169-174, 1992.

Biodegradación de la Lignina

Lignin Biodegradation

Angel T. Martínez (Jefes de Grupo) Personal Científico
Aldo González (*Group leaders*) *Tenured Scientists*

Myriam Blanco
María Jesús Martínez

María Luz Fidalgo Postdoctorales
Francisco Guillén *Postdoctoral Fellows*

Ana Caivo Predoctorales
Susana Camarero *Graduate Students*
Ana Gutierrez

Eloisa Liñan
Ana López-Archilla
Carmen Muñoz
Carmen Terrón
Eduardo Valenzuela
Elsa Varela

Sabine Kühn Pregraduados
Lucilla Caramelo *Undergraduate Students*

Angellnes Guíjarro Personal Técnico
Teresa Raposo *Technical Staff*



Caracterización del sistema ligninolítico en el género *Pleurotus* y evaluación del papel de la aril-alcohol oxidasa (AAO) en la degradación enzimática de la lignina.

Ciertas especies del género *Pleurotus* producen una degradación selectiva de la lignina y pueden ser utilizadas para la deslignificación de subproductos agrícolas. El mecanismo de la degradación de la lignina por estos hongos es poco conocido por lo que uno de los objetivos del Proyecto es la identificación de las enzimas responsables y el estudio de la de-

Characterization of the ligninolytic system in *Pleurotus* species and evaluation of the role of the aryl-alcohol oxidase in the enzymatic degradation of lignin.

*Several species from the genus *Pleurotus* cause selective degradation of lignin and could be used for the delignification of agricultural wastes. The lignin degradation mechanisms by these fungi are unknown, and the identification of the enzymes involved and the study of model dimer degradation are aimed in this Project. Due to lignin peroxidase*

gradación utilizando dímeros modelo. La eventual producción de lignina peroxidasa (LiP) por estos hongos no ha podido ser puesta de manifiesto, por lo que se investigará la existencia de la enzima utilizando anticuerpos anti-LiP y la presencia del gen mediante hibridación de DNA con una sonda preparada con PCR a partir de la secuencia de la LiP-H8 de *Phanerochaete chrysosporium*.

La aril-alcohol oxidasa (AAO), detectada en varias especies de *Pleurotus* y en otros hongos ligninolíticos, puede constituir una adecuada fuente de H₂O₂ durante la degradación de la lignina. La participación de la AAO en un sistema cíclico de producción de H₂O₂ que incluiría reductasas intracelulares, será investigada en *Pleurotus*. Con objeto de estudiar su presencia en diferentes hongos ligninolíticos, incluido *P. chrysosporium*, se purificará la AAO de *Pleurotus eryngii*, se determinará la secuencia amino terminal y secuencias internas, y se prepararán oligonucleótidos sintéticos. Utilizando éstos como iniciadores, se sintetizará mediante PCR un fragmento de DNA que, junto con los oligonucleótidos, serán usados como sondas de hibridación (Southern blot) para la detección del gen de la AAO en los basidiomicetos estudiados. Finalmente, se investigará la posible reducción por la AAO de los radicales aromáticos generados durante la degradación de la lignina, evitando su repolimerización.

Revalorización de la paja de trigo para la producción de pasta, papel y materiales poliméricos.

El objetivo de este proyecto es la utilización industrial de la paja para la produc-

(LiP) activity cannot be observed in these fungi, the presence of the enzyme will be investigated using anti-LiP antibodies, and the existence of the corresponding gene will be examined by DNA hybridization with a probe prepared with PCR from the sequence reported for the Phanerochaete chrysosporium LiP-H8 gene.

The aryl-alcohol oxidase (AAO) detected in several Pleurotus species and other ligninolytic fungi, can represent the suitable source for the H₂O₂ required in lignin degradation. The existence of a cyclic system for H₂O₂ production, including AAO and intracellular reductases, will be investigated in Pleurotus. In order to study the presence of AAO in different ligninolytic fungi, including P. chrysosporium, the Pleurotus eryngii enzyme will be purified. Synthetic oligonucleotides from the amino-terminal sequence of purified AAO will be prepared, and a DNA probe will be obtained by PCR, using as primers the terminal oligonucleotide and an oligonucleotide from an internal sequence after protease digestion. Both will be used as hybridization probes in Southern blot analyses for the screening of the AAO gene in the basidiomycetes studied. Finally, the participation of AAO in the reduction of the aromatic radicals generated during lignin degradation, preventing repolymerization reactions, will be studied.

Upgrading straw into pulp, paper and polymeric materials.

The objective of the project is the in-

ción de pastas de alto rendimiento, papel, fibras, films y aglomerados. Todos estos productos serán fabricados utilizando tecnologías basadas en procesos alternativos, y los problemas medioambientales asociados con el uso industrial de la paja serán objeto de especial atención. Para conseguir este objetivo el proyecto incluye los siguientes estudios (la participación del CIB concierne principalmente el punto e):

- a) Variedades de paja (preparación y almacenamiento)
- b) Pulpeo mediante explosión con vapor (STEX)
- c) Pulpeo mediante el procedimiento Bi-vis
- d) Producción de polímeros
- e) Decoloración biológica y ultrafiltración de los efluentes

La actividad de nuestro grupo ha sido centrada en dos objetivos en este proyecto. Primero, la caracterización química de la paja de trigo sometida a diferentes tratamientos de extracción de la lignina y la simulación en el laboratorio de las condiciones utilizadas en la industria para estimar los cambios químicos que en ella se han producido. Segundo, la decoloración biológica de efluentes de la industria papelera con hongos ligninolíticos. 83 hongos fueron probados para estimar su capacidad de decolorar el efluente. Esta capacidad se ensayó en medio sólido y líquido. Posteriormente, se optimizaron distintos parámetros (agitación, pH, temperatura, fuente de C, fuente de nitrógeno, aireación) en el proceso de decoloración. Los hongos que produjeron mayores tasas de decoloración fueron seleccionados para estudios posteriores.

Las investigaciones realizadas en este

ustrial utilisation of straw for the production of high yield pulps, papers, polymer fibers, films, and composites. All these products will be made using alternative process technologies: environmental problems associated with the industrial use of straw will be tackled during the project. To achieve this objective, the project include the following studies (the participation of CIB mainly concerns point e):

- a) Straw varieties, preparation and storage.*
- b) Steam explosion pulping (STEX).*
- c) Bi-vis straw pulping*
- d) Production of polymers.*
- e) Biological decolorization and ultrafiltration of effluents.*

Our group have been centered on two objectives in this project. First, the chemical characterization of the wheat straw subjected to different treatments of lignin extraction and laboratory simulation of the conditions used in industry to better estimate the chemical changes produced. Second, the biological decolorization of effluents from paper industry by ligninolytic fungi. 83 fungi were screened to test their ability to decolorize this effluent. This capacity was assayed in solid and liquid media. Subsequently, different parameters (agitation, pH, temperature, carbon source, nitrogen source, aeration) were optimized in the decolorization process. The fungi which produced the greatest decolorization were selected for further study.

The investigations realized in this

proyecto se relacionan altamente con las del segundo proyecto "Biopulping and biobleaching" que está orientado a disminuir la cantidad de lignina presente en la paja de trigo antes del proceso industrial de fabricación de papel y alternativamente mejorar la calidad de la pulpa mediante tratamiento biológico.

Biopulpeo y bioblanqueo

Este proyecto pretende desarrollar una alternativa biológica a los métodos químicos de pulpeo y blanqueo utilizados actualmente, a través del uso de organismos que producen enzimas ligninolíticas. Los objetivos específicos del proyecto son:

- a) aislar y caracterizar nuevos microorganismos de utilidad para su aplicación a la biodegradación de la lignina y comparación con los ya existentes
- b) Aislar los genes de las enzimas ligninolíticas y estudiar organismos compatibles para la clonación y expresión.
- c) Clonar y expresar los genes en uno de los huéspedes y comparar la actividad de las cepas "construidas" para producir o blanquear la pasta de papel.
- d) Comparar los sistemas de producción *in situ* de peróxido mediante métodos enzimáticos y no-enzimáticos.
- e) Optimizar el diseño de reactores para la aplicación de los sistemas biológicos para el biopulpeo, el bioblanqueo y el reciclado de papel.
- f) Llevar a cabo experimentos a escala piloto para la evaluación técnica y económica del proceso integrado de biopulpeo/bioblanqueo.

Aunque gran parte del trabajo se ha venido realizando desde hace tiempo con ce-

project are closely related to the second project "Biopulping and Biobleaching" which is directed at diminishing the quantity of lignin present in the wheat straw prior to the industrial process of paper fabrication and towards bettering the quality of pulp through biological treatment.

Biopulping and biobleaching.

This project aims at developing a biological alternative to the currently applied chemical pulping and bleaching methods by using organisms which produce ligninolytic enzymes. The specific objectives of the project are:

- a) To isolate and characterize new microorganisms useful for application to lignin bio-degradation and compare them with already available ones.*
- b) To isolate the ligninase genes and study compatible host organisms for gene cloning.*
- c) To clone and express the genes in one of the hosts and to compare the bleaching and pulping activity of the "constructed" strains.*
- d) To compare in situ non-enzymatic and enzymatic peroxide producing systems.*
- e) To optimize the reactor design for the novel application of these biological systems to biopulping, biobleaching and re-utilization of paper.*
- f) To conduct the experimental studies at pilot scale for making a technical and economical evaluation of an integrate biopulping/biobleaching process.*

pas salvajes de hongos y actinomicetos es evidente que para conocer los mecanismos de los microorganismos sobre la lignina se hace imprescindible iniciar estudios de biología molecular. El objetivo de dichos estudios será en una primera etapa el de localizar y aislar los genes implicados en la producción de las diferentes enzimas ligninolíticas. Estas enzimas que están presentes en algunos hongos filamentosos especialmente basidiomicetos son responsables de la ruptura de la gran variedad de enlaces intermonoméricos en la lignina. También es necesario señalar que las enzimas que degradan la hemicelulosa tienen especial interés por la interrelación de enlaces entre este polímero y la lignina.

De forma paralela se han investigado sustratos alternativos para la producción de pulpa, como el bagazo de caña de azúcar tras fermentación en estado sólido. El conjunto de los trabajos del grupo está orientado a optimizar las especiales características de los hongos que actúan sobre la lignocelulosa produciendo degradación selectiva de la lignina o simultánea de todos los polímeros estructurales.

Por otro lado en el sur de Chile se han llevado a cabo estudios de madera de *Pinus radiata* D. Don almacenada en el campo para estimar la degradación tras el ataque sufrido por diferentes especies de hongos.

Durante 1992, se han iniciado en conjunto con un grupo del CBM-CSIC un trabajo para aislar y caracterizar hongos y levaduras que se desarrollan en ambientes extremófilos (acidófilos y termófilos). Por último en colaboración con la Universidad

Although a great part of the work has been carried out by wild strains of fungi and actinomycetes for some time, it is evident that to further understand the mechanisms of these microorganisms it will be necessary to initiate studies of molecular biology. The aim of said studies in a preliminary stage would be to locate and isolate the genes responsible for the production of the different ligninolytic enzymes. These enzymes which are present in some filamentous fungi, specially basidiomycetes, are responsible for the cleavage of great variety of intermonomeric bonds in lignin. It is also important to note that the enzymes which degrade hemicellulose are of special interest in the interrelation of bonds between this polymer and lignin.

Collaterally, alternative substrates for the production of pulp have been investigated, such as sugarcane bagasse after solid state fermentation. The overall goal of the group is oriented towards optimizing the special characteristics of the fungi which act upon the lignocelulose producing selective degradation of lignin or simultaneous degradation of all structural polymers.

*In the South of Chile, studies upon *Pinus radiata* (D. Don) wood have been carried out to estimate the degradation suffered by the attack of different fungal species. In 1992 a common study was initiated with CBM-CSIC to isolate and characterize fungi and yeast which develop in extremophile environments (acidophiles and thermophiles). In collaboration with the University of Cór-*

de Córdoba se han puesto en marcha estudios sobre hongos y levaduras que se desarrollan en alimentos desecados para determinar la producción de aflatoxinas y metabolitos secundarios con el objetivo de redefinir las normativas vigentes de control de calidad de alimentos. □

doba a study has been initiated on fungi and yeasts which grow in dry foodstuffs to determine the production of aflatoxines and secondary metabolites with the objective of redefining current regulations for the control of food quality. □

Científicos Invitados

Invited Scientists

- Lda. Grizel Delgado. ICIDCA, La Habana, Cuba.
- Ingeniero Mariana Mansur. ICIDCA, La Habana, Cuba.

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- Convenio Hispano-Cubano (CSIC-CECE).
- PGC, PB87-0243 (1988-91)
- PLANICYT, Programa Biotecnología SEUI BIO88-185 (1988-1991)
- PLANICYT, Programa Biotecnología BIO89-0816-E (1989-1990)
- PLANICYT, Programa Biotecnología BIO90-0328-E (1990-1991)
- CAM, C104-91 (1991-1994)
- CEE, Programa ECLAIR. Contrato CE AGRE-47 (1990-1994)
- CEE, Programa ECLAIR. Contrato CE AGRE-44 (1991-1995)
- PLANICYT, Programa Biotecnología SEUI, BIO91-1281-C03-CE (1991-1994)
- PLANICYT, Programa Biotecnología CICYT, BIO92-357 (1992-1995)

Publicaciones

Publications

- Almendros, G., Martínez, A.T., González, A.E. Fründ, R. and González-Vila, F.J.: CP1445, PG 1445: A new fungus from wheat straw transformed by five lignocellulose-degrading fungi. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1207-1211, 1992.
- Barrasa, J.M., González, A.E. and Martínez, A.T.: Ultrastructural aspects of fungal degradation of wheat straw by *Geotrichum australe* and *Phlebia chrysocrea*. A study of natural and *in vitro* degradation. *Zeitschrift für Mikroskopische Technik* 10: 1-6, 1992.
- Boris, R., Mendoza, J.A. y González, A.E.: Estudio crítico de la digestión anaerobia de residuos obtenidos con paja previamente tratada con *Geotrichum candidum*. *Grasas y Aceites* 43(4), 219-225, 1992.

Publicaciones (Continuación)

Publications (Continued)

- García, A.M., Martínez, A.T. and González, A.E.: Biological decolorization of effluents from paper industry by fungi. *Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent* 56, 1565-1567, 1991.
- Delgado, G., Guillén, F., Martínez, M.J., González, A.E. and Martínez, A.T.: Light stimulation of aryl-alcohol oxidase activity in *Pleurotus eryngii*. *Mycol. Res.* 86, 984-986, 1992.
- Delgado, G., Fidalgo, M.L., Mansur, M., Martínez, E.O., Ortega, G., Martínez, A.T. and González, A.E.: Lignin alteration during the solid-state fermentation of sugarcane wastes with *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium*. In: "Biotechnology in Pulp and Paper Industry". (Eds.) Kuwahara, M., Shimada, M. pp. 209-214. UNI Pub. Co. Ltd., Tokyo, 1992.
- Guillén, F., Martínez, A.T., and Martínez M.J.: Aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*: Substrate specificity and H₂O₂-producing system. In *Biotechnology in Pulp and Paper Industry*. (Eds.) Kuwahara, M., Shimada, M. pp. 371-376. UNI Pub. Co. Ltd., Tokyo, 1992.
- Jiménez, M., González, A.E., Martínez, M.J., Martínez, A.T. and Dale, B.E.: Screening of yeasts isolated from decayed wood for lignocellulose-degrading enzymatic activities. *Mycol. Res.* 95, 1299-1302, 1991.
- Kühn, S., Camarero, S., Valmaseda, M., Almendros, G., Martínez, M.J., González, A.E., and Martínez A.T.: Straw biopulping: Selective delignification with *Pleurotus eryngii*. In: "Biotechnology in Pulp and Paper Industry". (Eds.) Kuwahara, M., Shimada, M. pp. 15-20. UNI Pub. Co. Ltd., Tokyo, 1992.
- Martínez, A.T., Barrasa, J.M., Prieto, A., and Blanco, M.N. Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. *Mycol. Res* 95, 782-784. 1991.
- Martínez, A.T., González, A.E., Valmaseda, M., Dale, B.E., Lambregts, M.J., and Haw, J.F. Solid-state NMR studies of lignin and plant polysaccharide degradation by fungi. *Holzforschung*, 45 (supplement), 49-54, 1991.
- Martínez, A.T., González, A.E., Prieto, A., González-Vila, F.J., and Fründ, R. *p*-Hydroxyphenyl:gualacyl:syringyl ratio of lignin in some austral hardwood estimated by CuO-oxidation and solid-state NMR. *Holzforschung*. 45, 279-284, 1991.
- Martínez, A.T., González, A.E., Martínez, M.J., Guillén, F. y Barrasa, J.M.: Biotecnología en la industria papelera: Utilización de los hongos y sus enzimas en la fabricación de papel y en el tratamiento de efluentes. *Rev. Iberoam. Micol.* 9, 74-78, 1992.
- Martínez, A.T., Almendros, G., Martínez, M.J., Valmaseda, M. and González, A.E.: Changes in the polydispersity of colloidal lignins by ligninolytic basidiomycetes. *J. Biotechnol.* 25, 333-339, 1992.
- Martínez, M.J., Alconada, M.T., Guillén, F., Vazquez, C., and Reyes, F.: Pectic activities from *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: Purification and characterization of an exopolysaccharuronase. *FEMS Microbiol. Lett.* 81, 145-150, 1991.
- Muider, M., Pureveen, J.B.M., Boon, J.J., and Martínez A.T.: An analytical pyrolysis mass spectrometry study of *Euchryphia cordifolia* wood decayed by white-rot and brown-rot fungi. *J Anal. Appl. Pyrolysis* 19, 175-191, 1991.

Publicaciones (Continuación)

Publications (Continued)

- Ortega, G.M., Martínez, E.O., Betancourt, D., González, A.E. and Otero, M.A.: Bioconversion of sugarcane residues with white rot fungi *Pleurotus sp.* *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 402-405, 1992.
- Pérez-García, F., Ceresuela, J.L., González, A.E. and Aguinagalde, I.: Flavonoids in seed coats of *Medicago arborea* and *M. strasserii* (Leguminosae): Ecophysiological aspects. *J. Basic Microbiol.* 32, 241-248, 1992.
- Terrón, M.C., Fidalgo, M.L., Manzanares, P., Ballesteros, M., Sáez, F., Martín, C. and González, A.E.: Chemical characterization and biological decolorization studies of effluents from wheat straw alkaline pulping. *Med. Fac. Lanaboww. Riiksuniv. Gent.* 56, 1569-1571, 1991.
- Terrón, M.C., Calvo, A.M., Fidalgo, M.L., Manzanares, P., Ballesteros, M., Martínez A.T., Martín, C. and González, A.E.: Chemical characterization and biological decolorization by fungi of effluents from wheat straw alkaline pulping. In: *Biotechnology in Pulp and Paper Industry*. (Eds.) Kuwahara, M., Shimada, M. pp. 51-56. UNI Pub. Co. Ltd., Tokyo, 1992.
- Valmaseda, M., Almendros, G., and Martínez A.T.: Chemical transformation of wheat straw constituents after solid-state fermentation with selected lignocellulose-degrading fungi. *Biomass Bioenergy* 1, 261-266, 1991.
- Valmaseda, M., Martínez, M.J., and Martínez A.T.: Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* - Lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 35, 817-823, 1991.

Genética Molecular de Plantas

Molecular Genetics in Plants

Isabel Paz-Ares	(Jefe de Grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Concepción Avila Seoiz Concepción Nieto Mazarrón		Postdoctorales Postdoctoral Fellows
Manuel Espinosa Urgel Joaquín Iglesias González Roberto Solano Tavira		Predoctorales Graduate Students
M^o Jesús Benito García		Personal Técnico Technical Staff

Genes reguladores de la síntesis de flavonoides. La familia de los genes reguladores *myb* en plantas.

Los flavonoides son metabolitos secundarios en las plantas, implicados en una serie de caracteres de gran interés básico y/o aplicado: coloración, protección frente a luz ultravioleta y patógenos, viabilidad de polen, etc. Una forma de influenciar dichos caracteres sería mediante la manipulación de los genes reguladores de la ruta de biosíntesis de estos metabolitos, una ruta biosintética ramificada. La familia de los genes *myb*, denominados así por estar relacionados con los oncogenes *myb* animales, es una de las tres familias génicas que regulan la síntesis de flavonoides. Se trata de una familia génica, representada por un gran número de genes (más de 20 en cada especie vegetal); sin embargo, en estos momentos solo se tiene certeza de la participación de dos genes *myb* en la

Genes regulating flavonoid biosynthesis. The myb gene family in plants.

Flavonoids are plant secondary metabolites involved in several relevant traits: coloration, protection against UV light and pathogens, pollen viability, etc. One way to influence such traits could be the manipulation of the regulatory genes of the flavonoid biosynthetic pathway, a branched pathway. The myb gene family, a group of genes related to animal myb oncogenes, is one of the three gene families known to be involved in the regulation of flavonoid biosynthesis. This family is very large (more than 20 members in each plant species); however, at present, only two myb genes have been shown to control this pathway, the maize C1 and P genes. To study the role of the different myb genes in the regulation of flavo-

regulación de esta ruta metabólica, los genes *C1* y *P* de maíz. Previamente en nuestro laboratorio habíamos clonado tres genes *myb* de petunia (*myb.Ph1-3*), con objeto de estudiar el papel de los distintos genes *myb* en la regulación de la síntesis de flavonoides. Desde entonces, hemos cubierto los siguientes objetivos:

1.- Secuencia reconocida por la proteína *MYB.Ph3*: Mediante selección a partir de una mezcla de oligonucleótidos degenerados, se pudo determinar la secuencia de DNA por la que *MYB.Ph3* muestra la mayor afinidad (AaaC/tG/C/AGTTA) que resultó muy parecida a la reconocida por las proteínas MYB animales (CG/C/AGTTA/G). Dicha secuencia también puede unirse a *MYB.Ph2*, como cabría esperar dado que las proteínas MYB de plantas se parecen más entre sí que con las de animales. Estos resultados sugieren que los distintos genes *myb* podrían coincidir en alguno de los genes bajo su control, lo que ocurriría si cada uno de ellos regulase la síntesis de un determinado flavonoide.

2.-Estructura del gen *myb.Ph3*: El gen *myb.Ph3* contiene tres intrones. En su promotor se encuentra la secuencia ACATAGTTA, por lo que la actividad de este gen podría estar regulada por su propia proteína (y por otras relacionadas)

Regulación de la respuesta de las plantas a bajas concentraciones de fosfato en el medio. Bases genético-moleculares.

Las plantas han desarrollado un sistema de respuesta al crecimiento a bajas concentraciones de fosfato en el suelo. En

noid biosynthesis, we had previously cloned three myb genes from petunia. Since then, the following objectives have been covered:

1.- *DNA-binding sequence of MYB.Ph3 protein: Using a binding site selection technique, the DNA sequence recognised by MYB.Ph3 could be established: AaaC/tG/C/AGTTA. This sequence is very similar to that corresponding to animal MYB proteins and could also bind to MYB.Ph2, as it could be expected, since plant MYB proteins resemble more each other than to any of their animal counterparts. These results suggest that plant myb genes could share some of their targets in common, a possibility compatible with each plant myb gene regulating the synthesis of a different flavonoid.*

2.- *Structure of the myb.Ph3 gene: myb.Ph3 contains three introns. The sequence ACAAGTTA is present within its promoter; thus, the transcriptional activity of this gene could be regulated by its own protein (as well as by related proteins).*

Regulation of plant responses to low free-phosphate in the soil. A genetic and molecular approach.

Plants have evolved systems to respond to low free phosphate in the soil. In our laboratory we have started to study the molecular and genetic basis of this rescue system, using A. thaliana: as model plant. So far,

nuestro laboratorio hemos iniciado un análisis genético y molecular de este sistema, utilizando *A. thaliana* como planta modelo. Hasta el momento se han abordado los siguientes aspectos del proyecto:

1.- Inducción del transportador de fosfato. Aislamiento de mutantes: La inducción del transportador de fosfato en plantas deficientes en fosfato se ha detectado en experimentos de absorción de P32. Dada la facilidad para detectar alteraciones en la actividad del transportador se han podido aislar varios mutantes afectados en el sistema de respuesta a deficiencias en fosfato. Dichos mutantes se están caracterizando en la actualidad.

2.- Inducción de actividades enzimáticas: Se ha comprobado que el ayuno en fosfato conlleva la inducción de dos fosfatasas y de al menos tres RNasas. Una de las RNasas se secreta, por lo que se ha podido purificar fácilmente. En colaboración con los Dres. Varela y Giménez-Gallego se ha determinado una parte de su secuencia N-terminal, lo que ha permitido la clonación de su cDNA. En estos momentos se dispone del correspondiente clon genómico por lo que se podrán estudiar las secuencias *cis* responsables de la inducción del gen de la RNasa secretada en plantas crecidas en medio deficiente en fosfato. □

the following aspects of the project have been investigated:

1.- Induction of the phosphate transporter: The induction of the phosphate transporter in plants under phosphate starvation was shown in P32 uptake experiments. The ease with which alterations in the phosphate transporter can be detected has allowed the isolation of several mutants affected in the phosphate starvation rescue system. The characterization of these mutants is underway.

2.- Induction of enzymatic activities: Phosphate deficiencies have been shown to induce two phosphatases and, at least three RNases. One RNase is secreted and, therefore, could be easily purified. In collaboration with Drs. Varela and Giménez-Gallego, a part of its N-terminal sequence was determined allowing the isolation of its cDNA clone. At present, the corresponding genomic clone is available and work is in progress to determine the cis-acting sequences responsible for the inducibility of the rnaase gene in plants grown under phosphate limiting conditions. □

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- CEE, BRIDGE BIOT, 0164-C (EDB) (1991-1993)
- CEE, BIOTEC, (1993-1995)
- CICYT, BIO-903/90 (1991-1993)

Publicaciones

Publications

-Wienand, U., Scheffler, B., Franken, P., Schrell, A., Niesbach-Klosgen, U., Tapp, E., Paz-Ares, J. and Saedler, H.: Molecular analysis of anthocyanin genes of *Zea mays*. In: *Plant molecular Biology 2*, (Eds.) Herman, R.G. and Larkins, B. Plenum Press NY. pp 747-755, 1991.

Organización Nuclear Durante el Desarrollo de Plantas

Nuclear Organization During Plant Development

M^a Carmen Risueño	(Jefe de Grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Adela Olmedilla Arnal (Hasta VII-1992)		Postdoctorales Postdoctoral Fellows
Pilar Sánchez Testillano		
Concepción Gómez Mena		Predoctorales Graduate Students
Pablo González-Melendi		
Begoña Fadón Salazar		Investigadora Asociada Associate Scientist
Carlos Almarza Sanz		Personal Técnico Technical Staff



Actualmente nuestras líneas de trabajo son:

1. Desarrollo del cultivo *in vitro* de anteras y granos de polen para la obtención de haploides con vistas a la mejora vegetal. Estudio de las bases celulares de la vía androgénica de desarrollo.

2. Estudio de la compartimentalización funcional del núcleo en células germinales y somáticas de plantas comparando el desarrollo *in vivo* e *in vitro*.

a) Transcripción ribosomal y arquitectura nucleolar: localización *in situ* de snoRNAs y proteínas asociadas, DNA y diferentes especies de rRNA.

b) Determinación de los *pattern* de cromatina en relación a la actividad nu-

We are working in the following topics:

1. Development of *in vitro* culture of anthers and pollen grains to obtain haploids for plant breeding, and study of the cellular basis of the androgenetic pathway of development.

2. Study of the functional compartments of the nucleus in germinal and somatic plant cells. A comparative *in vivo* and *in vitro* study.

a. Ribosomal transcription and nucleolar architecture: *In situ* localisation of snoRNAs and associated proteins, DNA and different species of rRNA.

b. Determination of the chromatin

clear durante la maduración del polen e inducción de androgénesis, localización de lugares de replicación y su relación con el estado de condensación de la cromatina.

c) Caracterización de las estructuras subcelulares donde residen los procesos de síntesis, "splicing", procesamiento y transporte de mRNAs. Localización *in situ* de proteínas los snRNPs, RNA y DNA.

d) Determinación *in situ* de elementos que intervienen en la expresión génica mediante microanálisis de Rayos X al MET.

Estos estudios se realizan mediante autorradiografía de alta resolución, inmunofluorescencia, inmunomarcado con oro e hibridación *in situ* con sondas no-radiactivas al MET, incorporación *in vivo* de BrdU y posterior inmunomarcado con oro. En paralelo se combinan con citoquímicas ultraestructurales específicas y/o preferenciales para DNA y RNA y con nuevos métodos para detección de DNA y RNA tales como la reacción de la TdT y la "nick translation" *in situ*.

3. Diseño y desarrollo de métodos de crioprocésamiento como alternativa a otras técnicas de procesamiento, que permiten preservar la antigenicidad, reactividad química y ultraestructura de la célula más cercana al estado *in vivo* y, por tanto, presentan muchas ventajas para estudios de inmunomarcado con oro, hibridación *in situ* al M.E.T. y microanálisis de rayos X.

4. Estudios subcelulares de las posibles modificaciones inducidas por biorreguladores del crecimiento. Acción del PBZ

pattern in relation to the nuclear activity, during pollen maturation and androgenesis induction. Localisation of replication sites in relation to the state of chromatin condensation.

c. Characterisation of subnuclear structures where synthesis, splicing, processing and transport of mRNAs take place. In situ localisation of proteins associated with the snRNPs, RNA and DNA.

d. In situ determination of elements involved in the nuclear gene expression by X-ray microanalysis at T.E.M.

These studies are performed by high resolution autoradiography, immunofluorescence, immunogold labelling and non-isotopic in situ hybridisation at T.E.M., in vivo BrdU incorporation and subsequent immunogold labelling. These techniques are combined with ultrastructural cytochemistry specific for nucleic acids, and with new methods for DNA and RNA localisation as the TdT reaction and the in situ nick translation.

3. Design and development of methods of cryoprocessing as alternative to other processing techniques, they allow the preservation of cell antigenicity, chemical reactivity and ultrastructure nearer to the in vivo state; therefore, they offer many advantages for immunogold labelling, high resolution in situ hybridisation and X-ray microanalysis studies.

y de la deficiencia de Mn sobre la estructura fina de diferentes compartimentos celulares en hojas de plantas de interés económico (*Prunus*).

5. Acción de poliaminas durante la embriogénesis del polen y el proceso de senescencia inducido por choque osmótico. Inmunolocalización de distintos elementos tilacoidales en hojas durante este proceso.

En nuestro proyecto colaboran: Lda. M^a Angeles Ollacanizqueta (Servicio de M.E. del CIB y la Dra. Amelia Sánchez Pina (CEBAS, CSIC, Murcia). □

4. *Subcellular study of the possible modifications induced by the bioregulators of growth. Action of the PBZ and Mn-deficiency over the fine structure of different cell compartments in leaves of economically interesting plants (Prunus).*

5. *Action of polyamines during the pollen embryogenesis and in the senescence process induced by osmotic shock. Immunolocalization of different elements of tilacoids in leaves during this process.* □

Científicos Invitados *Invited Scientists*

- Dr. Raska. Inst. of Experimental Medicine. (Praga, Checoslovaquia).
- Dr. Tandler. CONICET Univ. Buenos Aires.
- Dr. Besford. AFRC (Littlehampton, U.K.).
- Dr. Vicente. Univ. Viena, (Viena, Buenos Aires, Argentina Austria).
- Dr. Dundr. I. of Exp. Medicine, (Praga, Checoslovaquia).
- Dr. Ahmadian, Univ. Agriculture de Tehram, (Tehran, Iran).

Organismos Financiadores *Funding Agencies*

- DIGICYT, PB87C-0332-C02-00 (1987-1993)
- DIGICYT, PB87C-0332-C02-01 (1987-1993)
- Diputación General de Aragón (1991-1993)
- Proyecto de Cooperación Hispano-Argentino CSIC/CONICET (1991)
- Proyecto de Cooperación Hispano-Checoslovaco. CSIC - Academia Checoslovaca de Ciencias. (1991-1992)
- Proyecto de Cooperación Hispano-Austriaco. CSIC/Universidad de Viena. (1991-1993)
- Proyecto de Cooperación Hispano-Británico. CSIC - Universidad de Barcelona - AFRC. (1990-93)

Publicaciones

Publications

- Olmedilla, A., Testillano, P.S., and Risueño, M.C.: Criofijación. En: *Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica*. Durfort M, Renau J, Serratos J, Vilaró S. (Eds.). Public. Univ. Barcelona. pp. 99-108, 1991.
- Risueño, M.C., Testillano, P.S., and Olmedilla, A.: Crioultramicrotomía. En: *Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica*. Durfort M, Renau J, Serratos J, Vilaró S. (eds) Public. Univ. Barcelona. pp. 189-204, 1991.
- Testillano, P.S., Olmedilla, A., Sánchez-Pina, M.A., and Risueño, M.C.: Detection of small nuclear RNAs in plant nuclei. In: *New approaches for in situ detection of DNA-RNA molecules*. Eds. CFIME. Univ. Barcelona pp. 38-39, 1991.
- Testillano, P.S., Sanchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., Ollacarizqueta, M.A., Tandler, C.J., and Risueño, M.C.: A specific ultrastructural method to reveal DNA: The NAMA-Ur. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 1427-1438, 1991.
- Olmedilla, A., Schrauwen, J., and Wullems, G.: Visualization of starch synthase expression by *in situ* hybridization during pollen development. *Planta* 184, 182-186. 1991.
- Reijnen, W.H., Van Herpen, M.M.A., De Groot, P.F.M., Olmedilla, A., Schrauwen, J.A.M., Weterings, K.A.P., and Wullems, G.J.: Cellular localization of a pollen-specific mRNA by *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Sex Plant Reprod.* 4, 254-257, 1991.
- Fadon, B., Olmedilla, A., and Risueño, M.C.: Ultraestructura del grano de polen durante el cultivo *in vitro* de anteras de *Capsicum annuum*. En: *Microscopía Electrónica*. J Vilches, A López. (Eds.). Univ. Cádiz. pp. 57-58, 1992.
- Testillano, P.S., Olmedilla, A., Sánchez-Pina, M.A., Raska, I., and Risueño, M.C.: The use of ultrathin cryosections for immunoelectron microscopy in plant nucleus. *Electron Microsc.* vol. 3, 87-88, 1992.
- Olmedilla, A., Testillano, P.S., Raska, I., and Risueño, M.C.: *In situ* nick translation and anti-BrdU techniques as convenient tools to study the functional regions of chromatins in plants. *Electron Microsc.* vol. 3, 193-194. 1992.
- Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., López-Iglesias, C., Olmedilla, A., Christensen, M.E., and Risueño, M.C.: Distribution of B-36 nucleolar protein in relation to transcriptional activity in plant cells. *Chromosoma* 102, 41-49, 1992.

Fijación Directa del N₂ Direct N₂ Fixation

Antonio Martín González	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientist
Pilar Marín López Mercedes Moreno Paz		Predoctorales Graduate Student
M^a José Tobajas Martín		Personal Técnico Technical Staff

Estudiamos la fijación de N₂ por mutantes específicos de *Azotobacter* y *Azospirillum* para su empleo como biofertilizantes.

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

Como aditivo para piensos compuestos investigamos las enzimas producidas por mutantes más activos de *B. subtilis* obtenidos en nuestro laboratorio.

Estudiamos la biosíntesis de etanol por *Zymomonas*.

Ensayamos nuevos antivirales frente a distintos tipos de virus animales y vegetales.

Estudiamos factores de crecimiento con mayor actividad.

We are studying the N₂ fixation by specific mutants of Azotobacter and Azospirillum in order to use them as biofertilizers.

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

*As an additive to composed fodder, we are investigating the enzymes produced by *B. subtilis* mutants, obtained in our laboratory with a greater production and yield.*

*We study the ethanol biosynthesis by *Zymomonas*.*

We try out new antivirals against different types of animal and vegetal virus.

We are studying growth agents with a higher activity.

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- CSIC, ID 88AA148.
- PGC-MEC, PB87-0243.
- NOREL SA (1991-1992)

Patentes
Patents

- Martín, A., Moreno, M., and Martín, P.: "Procedimiento de activación microbiológica en la fijación de nitrógeno". Patente nº 9200762, 1992

Marcadores Tumorales y Procesos de Envejecimiento

Tumoral Markers and Ageing Processes

Angela Casado Moragón

(Jefe de grupo)
(Group leader)

Personal Científico
Tenured Scientist

Diana Carrascosa Sáez

Predoctoral
Graduate Student

M^a Encarnación López Fernández

Personal Técnico
Technical Staff

Utilización de Alfa Feto Proteína (AFP) como marcador de procesos tumorales.

Con esta línea de investigación, se pretende la puesta a punto de un nuevo método de pronóstico y/o diagnóstico (valoración de Alfa-feto proteína (AFP) en suero) en pacientes afectos de procesos oncológicos de muy diversa etiología, con objeto de evaluar su significado como marcador tumoral y proporcionar información adecuada sobre el tamaño o tasa de crecimiento del tumor. En segundo lugar, se pretende analizar el cambio en la secreción de AFP, producida en pacientes que no han sido sometidos a tratamiento previo, y en pacientes que si han sido sometidos a terapia adicional, para estudiar en ambos casos, la respuesta al tratamiento instaurado, ya que niveles elevados de AFP pueden indicar una peor respuesta a la terapia administrada mientras que niveles en descenso pueden indicar una respuesta favorable.

Alpha-fetoprotein as a tumoral marker.

This project focuses on a new method of diagnosis and/or prognosis (serum Alpha-fetoprotein (AFP) levels) in patients with various types of malignant neoplasms, in order to determine its value as a marker for various tumours and provide us with valuable information about the size or growth rate of the tumour. Second, to analyze the change of secretion of AFP in patients not having been treated and in patients requiring additional therapy, to evaluate in both the response to the treatment administered, so that rising levels indicate poor response to the therapy and falling levels indicate a favourable response to therapy.

Socio-sanitary profile of ageing

This project focuses on the process of ageing, in the population of Ma-

Envejecimiento: perfil sociosanitario de la población anciana de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Con esta línea de Investigación nos proponemos realizar una aproximación al conocimiento del proceso de envejecimiento que está afectando a la población de la Comunidad Autónoma de Madrid, con objeto de diferenciar los cambios fisiológicos normales del paso de los años (envejecimiento) de aquellos asociados con diferentes patologías y enfermedades tales como: procesos oncológicos, enfermedades neurológicas, principalmente demencia senil precoz, demencia tipo Alzheimer, Parkinson; patologías articulares, diabetes, etc. Con este estudio, basado en la teoría de los Radicales Libres, se analizará la actividad de dos detoxificantes celulares Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT), en individuos de ambos sexos y de 50 años en adelante con buen estado de salud y/o con enfermedades relacionadas con el envejecimiento y procedentes de zonas urbanas, suburbanas y rurales de la Comunidad Autónoma de Madrid. □

drid Autonomic Community. In order to determine the physiological changes coming from ageing versus those originated by various pathologies and illnesses (tumours, neurologic diseases like early senile dementia, dementia of the Alzheimer type, Parkinson's disease, sensorial pathologies, diabetes...) we try to determine Free Radicals detoxificants enzymes activity, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in individual of the two sexes, older than 50 years, healthy or with ageing related illness and setting in urban, suburban and rural zones in Madrid Autonomic Community. □

Organismos Financiadores *Funding Agencies*

- CAM Plan Regional de Investigación, Programa Salud (1991-1992).
- CAM, C128/91 (1991-1993).
- CAM, C078/92 (1992).

- Casado, A., De La Torre, M^oR., Ramírez, V., López-Fernández, M^oE., and Carrascosa, D.: Superoxide dismutase activity in Down syndrome. *Clin. Genet.* 40, 157-158, 1991.
- Casado, A., De La Torre, M^oR., López-Fernández, M^oE., and Ruiz Del Castillo, B.: Hematologic and biochemical observations in *Gazella dama*, *G. dorcas* and *G. cuvieri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B (3), 637-640, 1991.
- Casado, A., De La Torre, M^oR., López-Fernández, M^oE., and Gil-Alberdi, L.: Cell detoxificants and ageing. *Rev. Esp. Geriat. Gerontol.* 26, 170, 1991.
- De La Torre, M^oR., Casado, A., and López-Fernández, M^oE.: Superóxido dismutasa (SOD) y envejecimiento. *Sangre* 37 (3), 193-195, 1992.
- Casado, A., Casado, M^oC., De La Torre, M^oR., López-Fernández, M^oE., and Carrascosa, D.: Enzyme deficiencies as the cause hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. *Clin. Genet.* 42 (3), 160, 1992.

Bacterias y protozoos del hidrohábitat del Parque de Doñana

Bacteria and protozoa of the hydrohabitat of Parque de Doñana

Carmen Cándida González (Hasta VII/1991)
María A. Jareño Cañada

(Jefes de grupo)
(Group leaders)

Personal Científico
Tenured Scientists

Estudio *in situ* e *in vitro* de las interrelaciones entre poblaciones bacterianas y protozoos ciliados del hidrohábitat del Parque Nacional de Doñana.

El estudio de los ciliados se ha hecho con el fin de encontrar las posibles causas del diferente anidamiento de esporas de *Clostridium botulinum* en las lagunas y marisma del Parque Nacional de Doñana. Se hicieron muestreos estacionales en nueve puntos estudiando las características fisicoquímicas del agua. Después de aislar y clasificar diferentes especies de ciliados se seleccionaron algunas de las más aptas para estudios citológicos. Los experimentos *C. botulinum*-ciliados en el laboratorio, se han hecho con las especies *Stylonychia mytilus*, *Spirostomum ambiguum* y *Onychodromus acuminatus*. Los experimentos con las dos primeras están en la fase de inclusión para su estudio al microscopio electrónico. Los estudios con *O. acuminatus* demuestran la capacidad de esta especie para ingerir y digerir enormes cantidades de esporas. La digestión comienza por el protoplasto encontrándose a las cuarenta y ocho horas restos de las envueltas (esporangio y cortex) en diferentes fases de digestión. No aparece que se hayan producido daños en el citoplasma ni en los núcleos. □

Study in situ and in vitro of the interrelationship between the bacterial population and ciliated protozoa of the Parque Nacional de Doñana hydrohabitat.

The aim of the study of the ciliates in the National Park "Coto Doñana", is to find out the possible reasons for the variable shelters of Clostridium botulinum spores in the ponds and marsh of this park. Environmental parameters were measured in nine sampling sites. After isolation and classification of ciliates we have selected some species useful for cytological studies such as Spirostomum ambiguum, Stylonychia mytilus and Onychodromus acuminatus. The two first species are included for their study at ultrastructural level. The investigations with O. acuminatus - C. botulinum have demonstrated the high capacity of this species to ingest and digest the spores of this bacterium. The protoplast is the first digested. After twenty four hours from the spores ingestion many rests of the spores envelopes (sporangium, cortex) are seen in different stages of digestion inside the ciliates. Damage of the cytoplasm and nuclei are not observed. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- CICYT, PB88-0091 (1988-1991)

Publicaciones
Publications

-Jareño, M.A.: Macromolecular behavior during development of doublets in *Onychodromus acuminatus*. *Acta Protozool* 31, 143-150, 1992.

Virología Molecular

Molecular Virology

Eduardo Páez Abril

Jefe de grupo
(Group leader)

Personal Científico
Tenured Scientists

Carmen Gil Fernández

Alejandro de Carlos Villamarín

(Hasta V-1991)

Juan Carlos González Armas

(Desde VI-1991)

Postdoctorales
Postdoctoral Fellows

M^a Dolores García Villalón

Juan Carlos González Armas

(Hasta V-1991)

M^a Antonia Ortiz Casado

M^a Carmen Sancho Molina

(Desde II-1992)

Predctorales
Graduate Students

Francisco García Tabares

M^a Luisa Rodríguez Muñoz

(A tiempo parcial)

Personal Técnico
Technical Staff



Desarrollo de nuevas vacunas recombinantes y vectores de expresión basados en el virus *vaccinia*.

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 vírica, como es el caso de la viruela. El virus *vaccinia* ha recobrado últimamente el interés del mundo científico, debido a su posible utilización como vector de expresión de genes de gran importancia a nivel humano y veterinario y su consiguiente aplicación como nuevas vacunas recombinantes contra una gran va-

Safer recombinant vaccine vectors and improved expression vectors based on vaccinia virus.

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 is now being sought as an expression vector of genes with human and veterinary importance. However, in the past the complications that have been found associated with the practice of vaccination make it desirable to

riedad de enfermedades infecciosas. Sin embargo, las complicaciones que han aparecido en el pasado con la práctica de la vacunación, hace que sea deseable la búsqueda de cepas atenuadas del virus *vaccinia* con marcadores genéticos y fenotípicos definidos.

Nosotros hemos caracterizado varios genes involucrados en interacciones virus-huésped cuya posible función podría tener importantes implicaciones en virulencia. Estos genes son importantes en penetración y liberación del virus de la célula infectada, en diseminación vírica, en inducción de respuesta humoral y celular y en interferencia con los mecanismos de defensa del huésped. Se ha determinado la esencialidad y posible función de estos genes en la multiplicación vírica. Se han obtenido virus recombinantes y se está analizando la eficacia de estos recombinantes atenuados con respecto al virus salvaje con el fin de obtener vacunas recombinantes más seguras y mejores vectores de expresión.

Nucleósidos como nuevos agentes antivirales

Hemos ensayado la capacidad inhibidora de 55 compuestos de nueva síntesis en la multiplicación *in vitro* de diversos virus: **a)** virus humanos: herpes simple tipo I y II e influenza A. **b)** virus de animales: el virus de la peste porcina africana (vPPA). Entre los compuestos de nueva síntesis distinguiremos dos grupos: derivados de D-penicilamina y análogos de amantadina. Los resultados obtenidos no fueron relevantes por lo que se desestimó continuar la investigación con éstos compuestos.

search for attenuated strains of vaccinia virus with defined genetic and phenotypic markers.

We have characterized several genes involved in virus-host interactions, which have important implications in virulence. These genes are relevant in virus penetration and egress from the cell, in viral dissemination, in viral induction of humoral and cellular immunity and in modulation of the host defense mechanisms. The essentiality and possible role of the se genes in viral replication have been determined. Virus recombinants have been obtained and the efficacy of these attenuated virus recombinants when compared with the wild type virus will be tested in order to obtain safer recombinant vaccine vectors and improved expression vectors.

Nucleosides as new antiviral agents.

We have assayed the inhibitory capacity of fifty five newly synthesised compounds on the replication of several viruses in vitro, namely: a) human viruses: herpes simplex, type I and II and influenza A. b) animal viruses: African swine fever (ASFV).

The new compounds are classified in two groups: D-penicillamine derivatives and amantadine analogues. The results proved irrelevant and so we discontinued the study of these compounds.

Simultaneously we studied drugs of known activity which had not been tested against ASFV. These are

Paralelamente hemos realizado una investigación con drogas de actividad conocida para los otros virus pero que no habían sido estudiados frente al vPPA. Las dividiremos en tres grupos: polisacáridos sulfatados, sustancias aniónicas y análogos de adenosina.

Los dos primeros grupos inhiben la adsorción del vPPA a la célula. Los polisacáridos son los compuestos menos tóxicos entre los ensayados y los aniónicos los que producen una mayor inhibición en el rendimiento total de virus. Se ha determinado que las carragininas y el ácido aurintricarboxílico inhiben también en una fase temprana de la multiplicación vírica y el último inhibe además la síntesis de proteínas y la liberación del virus al medio.

Entre los 31 análogos de adenosina estudiados se encuentran los más potentes inhibidores con una concentración efectiva 50% (CE_{50}) por debajo de 1mg/ml (fluoroaristeromicina $CE_{50}=0,008$) y con índices selectivos (IS) superiores a 1.000.

El IS más elevado corresponde, después del (S) HPMPA estudiado anteriormente ($IS=15.000$) al 3-deazaneplanocin A ($IS=3.000$). Se sugiere que el mecanismo de acción de estos compuestos sea por inhibición de las metiltransferasas propias del virus encargadas de metilar los mRNAs víricos.

Sería aconsejable el ensayo *in vivo* de los compuestos inhibidores de la multiplicación del vPPA con un IS elevado, ya que podría abrir nuevos horizontes en la lucha contra la peste porcina africana contra la que, hoy por hoy, no existe vacuna. □

divided in three groups: sulfated polysaccharides, anionic substances and adenosine analogues.

All the drugs of the first two groups turned out to inhibit ASFV adsorption to the cell. The polysaccharides proved the least cytotoxic among all drugs assayed while the anionic compounds proved the most effective in inhibiting total virus yield. We also established that the carrageenan and aurintricarboxylic acid also inhibit an early stage of virus replication and the latter also inhibit protein synthesis and the release of virus to the medium..

Among the thirty one adenosine analogues studied we found the most potent inhibitors, with effective 50% concentration (CE_{50}) below 1 mg/ml (for fluoroaristeromycin $CE_{50}=0,008$) and with a selectivity index (SI) above 1,000.

The highest SI corresponds, after the (S) HPMPA previously studied (with $SI=15,000$) to 3-deazaneplanocin A, with $SI=3,000$. We suggest that the mechanism of action of these compounds is by inhibition of the methyltransferases of the virus which have the role to methylate the viral mRNAs.

It would be interesting to assay in vivo the compounds which inhibit ASFV with a high SI, as this might open new inroads into the fight against ASFV for which, so far, there is no vaccine. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- CICYT, FAR 88-0160-002-02 (1988-1991)
- CICYT, BIO88-0266, (1988-1991)
- CICYT, INFRA BIO91-187 (1991)
- C.C.A.A. Madrid, (1991)
- CICYT, BIO91-0602, (1991-1994)

Publicaciones
Publications

- García Villalón, D., and Gil Fernández, C.: Antiviral activity of sulfated polysaccharides against African swine fever virus. *Antiviral Res.* 15, 139-148, 1991.
- García Villalón, D., and Gil Fernández, C.: Anionic compounds as inhibitors of African swine fever virus replication in Vero cells. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 9-14, 1992.
- de Carlos, A , and Páez, E.: Isolation and characterization of mutants of vaccinia virus with a modified 94 kDa inclusion protein. *Virology* 185, 768, 1991.
- Páez, E.: Importancia de la Virología a nivel hospitalario. *Síntole* 102, 10, 1992.

Patologías Microbianas de Teleosteos

Microbial Pathology of Teleosts

M^a del Pilar Vilas Minondo	(Jefe de grupo) (Group leader)	Personal Científico Tenured Scientists
M^a del Carmen Gutierrez Rueda Sara Isabel Pérez Prieto Sylvia Rodríguez Saint-Jean		
M^a Luisa Rodríguez Muñoz (A tiempo parcial)		Personal Técnico Technical Staff
M^a Mercedes Sánchez Carmona		



Estudio de infecciones latentes en salmonídeos cultivados. Con este trabajo se pretende obtener nueva información sobre el fenómeno de persistencia y el estado de portador que originan dos de las enfermedades microbianas más importantes en la acuicultura de nuestro país: la Necrosis Pancreática Infecciosa, producida por un Bimavirus (IPNV) y la forunculosis producida por la bacteria *Aeromonas salmonicida*. Los animales portadores tienen gran trascendencia en la diseminación del agente patógeno. Se están estudiando *in vivo* e *in vitro* mecanismos y factores implicados en el establecimiento y duración del estado de portador. Estos estudios se llevan a cabo en células hematopoyéticas y eventualmente en productos sexuales (gametos) y vísceras. Utilizando para el IPNV los métodos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares susceptibles y las técnicas standard de identificación bacteriana para *A. salmonicida* y la citometría de flujo para ambos como método comparativo.

Transmisión vertical de virus en peces cultivados. En este proyecto se propone el estudio de la transmisión de virus de peces cultivados, especialmente de trucha

Persistent infections in reared salmonid fish. The aim of this project is to obtain new information on the carrier state and persistent infections that are caused by two microbial diseases in Aquaculture: infectious pancreatic necrosis, caused by a Birnavirus (IPNV) and the forunculosis produced by *Aeromonas salmonicida*. The carrier fish are involved in the vertical and horizontal spread of the pathogenic agent. Attention will be focussed on some factors involved in the establishment and evolution of the carrier state and will be studied *in vivo* and *in vitro*. The study will be carried out mainly in haematopoietic cells and eventually in sexual products by both: A) conventional *in vitro* methods, in susceptible cell culture and bacterial identification technics, B) flow cytometry.

Vertical transmission of virus in aquaculture. The purpose of this project is to study vertical transmission of viruses in reared fish, mainly rainbow trout, with the scree-

arco-iris, a través del material genético que entra por el aeropuerto de Barajas o del que se produce en instalaciones españolas y evaluar la actividad virucida de diversos compuestos químicos, biológicos y combinados para conseguir protocolos de toxicidad mínima. Su eficacia se evaluará frente a los virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa y de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa. Además estamos estudiando los perfiles electroforéticos y las características-tipo de los virus aislados tanto en el material genético como en otras muestras de salmónidos previamente aislados en nuestro laboratorio, para la organización de una colección de virus.

Control de patologías virales en instalaciones piscícolas. Este laboratorio mantiene colaboraciones con PYMES del sector de la acuicultura continental y marina, que proporcionan muestras para nuestra experimentación y detección de nuevos virus.

Además se presta asesoramiento científico y apoyo técnico que se plasman en contratos con distintas empresas.

ning of imported embrionated eggs, that arrived in Barajas airport, or those produced in spanish farms. The virucidal activity of some chemical and biological compounds have been evaluated against IPN and IHN viruses to obtain the effective minimum dose.

We are also studying the electrophoretic profiles and the characteristic types of isolated viruses from genetic products, as well as those obtained by us from other salmonid fish, in order to organize a virus collection.

Control of viral pathologies in fish farms. *Our laboratory collaborates with industries related to continental and marine aquaculture areas. They are the small or medium size of enterprises that usually send us fish samples for the in vivo experiments and to isolate new viruses. Moreover we also give them scientific advice and technical support through service contracts.*

Organismos Financiadores

Funding Agencies

- CICYT, MAR91-0365 (1991-1993)
- CAM, C229/91 (1991-1993)
- Contrato con la empresa NUTRISA S.A. (1992)
- Acción Especial Programación Científica del CSIC (1991)
- Contrato con la empresa SEAMASA (1991- 1992)
- Contrato con la empresa SMS Zootecnia (1992)

Publicaciones Publications

-Rodríguez Saint-Jean, S., Vilas Minondo, M.P., Palacios, M.A. and Pérez Prieto, S.: Detection of infectious pancreatic necrosis in carrier population of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), by flow cytometry. *J. Fish Dis.* 14, 545-553, 1991.

VECTORES CEDIG VECTORES CEDIG

Miguel Vicente
(A tiempo parcial)

(Jefe de grupo)
(Group leader)

Personal Científico
Tenured Staff

Martí Aidea (Hasta VIII-91)
(A tiempo parcial)

Postdoctoral
Postdoctoral Fellow

Angeles Sacristán

Personal Técnico
Technical Staff



VECTORES

CEDIG

La Colección Española de Datos de Ingeniería Genética (CEDIG) se encarga de la confección, gestión y distribución de una base de datos en la que se incluyen elementos genéticos y estirpes útiles en Biotecnología que se encuentran en diversos laboratorios españoles, tanto del CSIC como en otras instituciones públicas o privadas. Ha participado en éstos dos años en el diseño de un formato europeo para crear una base de datos de Plásmidos, Virus y elementos Transponibles, el formato PVT. La utilización de un formato común permitirá el intercambio de datos entre colecciones de los países de la Comunidad Europea. Teniendo como base éste formato se ha creado una base de datos, y el soporte informático necesario para su uso, en dBASE IV. En ella se han introducido los datos de los catálogos CEDIG 84 y VECTORES CEDIG, y se han repartido copias a los laboratorios colaboradores. □

The Spanish Collection of Genetic Engineering Data (Colección Española de Datos de Ingeniería Genética, CEDIG), is in charge of creating managing and distributing a database of genetic elements and strains useful for Biotechnology, that are found at Spanish institutions, both at the CSIC and at other public and private institutions. It has participated in the design of a European format to create a data base on Plasmids, Viruses and Transposable elements, the PVT format. The use of a common format facilitates the transfer of data between databases in the European Community countries. A database with appropriate software support has been created in dBASE IV using this format. This database contains the data from the CEDIG 84 and VECTORES CEDIG catalogues and has been distributed to the collaborating laboratories. □

Organismos Financiadores
Funding Agencies

- CICYT, BIO92-1346-E

Publicaciones
Publications

-Vicente, M. Aldea, M., Sacristán, A., Rohde, C., Weihs, V., Kracht, M., van Asma, F., Kampert, E., Hughes, V. and Jones, C.: A standardised format for handling data on plasmids, viruses and transposons: The PVT database format. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 519-526. 1992.

Tesis Doctorales *Doctoral Thesis*

- Teresa M^a Alconada Magllano**, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Directores: M. J. Martínez y M. A. Galvagno
- Carlos Alfonso Botello**, Universidad Complutense de Madrid, 1991. Directora: F. Reyes Ramírez
- Julio Avila Marrero**, Universidad Autónoma de Madrid, 1991. Director: J. Paz-Ares
- M^a Rosa Carballada**, Universidad Autónoma de Madrid, 1991. Director: P. Esponda
- M^a Angeles Cerezueta Rosique**, Universidad Complutense de Madrid, 1991. Directora: S. Moreno Díaz de la Espina
- Guadalupe Ciprés Palacín**, Universidad Complutense, 1991. Directora: A. Martín Requero
- Eduardo Díaz Fernández**, Universidad Complutense de Madrid, 1991. Director: J.L. García López
- Rufino Feito**, Universidad Autónoma de Madrid, 1991. Director: P. Esponda
- M^a Dolores García Villalón**, Universidad Complutense de Madrid, 1992. Directora: C. Gil Fernández
- Teresa Garrido**, Universidad Autónoma de Madrid. 1991. Director : M. Vicente
- Rafael Giraldo Suárez**, Universidad Complutense de Madrid, 1991. Director: R. Díaz Orejas
- Enrique Gómez Lahoz**, Universidad Autónoma de Madrid, 1992. Director: P. Esponda
- Juan Carlos González Armas**, Universidad Autónoma de Madrid, 1991. Director: E. Paez
- Francisco Guillén**, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, 1991. Directora: M.J. Martínez
- Luis Martín-Parras**, Universidad Complutense de Madrid, 1991. Director: J.B. Schwartzman y P. Hernández
- M^a Antonia Ortiz Casado**, Universidad Autónoma de Madrid, 1992. Director: E. Paez
- Leandro Peña García**, Universidad Autónoma de Madrid, 1992. Director: J.R. Díaz Ruíz
- José Pérez Martín**, Universidad Autónoma de Madrid, 1992. Director: M. Espinosa Padrón
- Alicia Prieto Orzanco**, Universidad complutense de Madrid, 1992. Director: J.A. Leal Ojeda

- Ricardo Ramos Ruiz**, Universidad Autónoma de Madrid, 1991. Director: V. Larraga
- Teresa Cristalina Rivas Calleja**, Universidad Complutense, 1991. Directora: M. Sánchez Ayuso
- Henri L. Robcis**, Universidad de Alcalá de Henares, 1992. Directora: F. de Pablo
- Allcia Romero Lorca**, Universidad Complutense de Madrid, 1991. Director: P. García González
- María Ronda Caubet**, Universidad Complutense de Madrid, Octubre de 1992. Director: J.M. Rojo Hernández
- Mª Jesús Ruiz Echevarría**, Universidad Autónoma de Madrid, 1992. Director: R. Díaz Orejas
- Nieves Sánchez**, Universidad Autónoma de Madrid.1991. Director: M. Vicente
- Pilar Sánchez Testillano**, Universidad Complutense de Madrid, 1991. Directora: Mª C. Risueño
- Jesús Miguel Sanz Morales**, Universidad Complutense de Madrid, 1991. Directores: J.L. García López y P. García González
- José Serrano Garri**, Universidad Autónoma de Barcelona, 1992. Directora: F. de Pablo
- Gloria del Solar Dongil**, Universidad Complutense de Madrid, 1991. Director: M. Espinosa Padrón
- Miguel Torres Sánchez**, Universidad Autónoma de Madrid, 1991. Director: L. Sánchez
- Elena Urcelay García**, Universidad Complutense, 1991. Director: R. Parrilla Sánchez
- Mohamed A.F. Yacout**, Universidad Complutense de Madrid, 1992. Directora: R. Beltrá Martínez de Velasco

Tesinas de Licenciatura *Master Thesis*

- Pilar Díaz Achirica**, Universidad Complutense de Madrid, 1992. Director: L. Rivas
- M^a José Felto** , Universidad Complutense de Madrid, 1991. Director: J. M. Rojo Hernández
- José Manuel González García**, Universidad Autónoma de Madrid, 1991. Directora: C. Goday
- Sabine Kühn**, Universität Karlsruhe, 1991. Directores: G. Jurzitza, A.E. González y A.T. Martínez
- Wafaa M. Masoud**, Universidad Autónoma de Madrid, 1992. Director: G. Gómez Alarcón
- M^a Luisa Muñoz Gómez**, Universidad de Alcalá de Henares. 1992. Director: G. Gómez Alarcón
- Pablo Pascual**, Universidad Pontificia de Comillas, Madrid, 1991. Director: J.A. Abrisqueta
- Jose M^a de Pereda Vega**, Universidad Autónoma de Madrid, 1991. Director: J.M. Andre
- Rosalba Pinzón**, Universidad Pontificia de Comillas, Madrid, 1992. Director: J.A. Abrisqueta.
- M^a Luisa Sánchez González**, UCM, 1991. Directoras: C. García Mendoza y M. Novaes-Ledieu
- M^a Angeles de la Torre**, Universidad Autónoma de Madrid, 1992. Director: G. Gómez Alarcón

Premios y Distinciones Awards and Honours

José Antonio Abrisqueta.

Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia, Madrid, 1992.

Asesor del Consejo Científico de la *European Down Syndrome Association* (EDSA), 1992.

Jesús Balsinde Rodríguez.

Premio "Gómez-Acebo" por el Centro de Investigaciones Biológicas y la Fundación Gregorio Marañón (Octubre 1991) de Tesis Doctorales. Director: F. Mollinedo.

Manuel Espinosa.

Editor invitado de la revista *Gene*, 1991.

Concepción García Mendoza.

Secretaria de la SEM (Sociedad Española de Microbiología).

Gonzalo Giménez Martín.

Miembro de la Academia Europea. 1991.

Presidente de Honor del V Congreso Iberoamericano de Biología Celular. Málaga, 1992.

Antonio de la Hera.

Miembro del Consejo Editorial de la revista *Inmunología*.

Miembro de la Comisión Nacional de Inmunología (Comité Asesor de los Ministerios de Educación y Sanidad).

Ana Mínguez Garrido.

Premio Extraordinario de Licenciatura de la Facultad de Farmacia. Sección de Químicas, 1991.

2º Premio Nacional de Farmacia, 1991.

Monique Novaes-Ledieu

Secretaria de la API (Asociación del Personal Investigador).

Adela Olmedilla.

Premio V Centenario de Biología Celular, Sociedades Española e Iberoamericana de Biología Celular.

Javier Paz-Ares.

Premio Sala-Trepat 1991. Fundación Sala-Trepat. Francia.

Miembro del Comité Editorial de la revista *The Plant Journal*. 1991-.

Eduardo Paez

Miembro del Consejo Editorial de la revista *Virología* (publicación oficial de la S.E.V.). 1992.

María Ronda Caubet y José María Rojo Hernández.

Premio Sandoz 1992 para trabajos de investigación (Real Academia de Farmacia).

José María Rojo Hernández.

Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia, Madrid 1992.

Miguel Vicente.

Miembro del *International Advisory Board* de *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1991-.

Organización de Congresos y Cursos *Organization of Congresses and Courses*

Patricio Aller.

Curso Académico de Doctorado "División y Diferenciación Celular". Departamento de Biología Celular, Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, 1991-1992.

José Manuel Andreu.

III Congreso de la Sociedad de Biofísica de España, Madrid, 1991. European Cytoskeletal Forum. Madrid, 1992. *Workshop on Protein Structure, Function and Engineering*, CIB-UCM. Madrid, 1992. (Comité organizador, con **Manuel Espinosa, Ramón Díaz, Jose Luis García y Augusto Silva**).

Pedro J. Aparicio.

Chairman del Comité de Cursos Avanzados y *Workshops* de la Federación de Sociedades Europeas de Fisiología Vegetal (FESPP) y Miembro del Comité Ejecutivo de dicha Federación.

María E. Arias, Aldo González y Angel T. Martínez.

Curso de Doctorado "Biodegradación de la lignina: posibles aplicaciones tecnológicas". Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, 1992.

Ramona Beltrá.

Curso Monográfico de Doctorado, "Fitopatología Bacteriana y Vírica". Universidad Complutense, Madrid, 1992.

Pedro Castañera.

Miembro del Comité Científico de la Conferencia Europea sobre "*Biological Control and Integrated Crop Protection*". Vedhaven, Holanda, 1991.

Ramón Díaz Orejas.

Comité Organizador local del EMBO *Workshop* sobre "*Promiscuous Plasmids in Gram-positive and -negative bacteria*". Las Navas del Marqués, Avila 1992.

Jose Ramón Díaz Ruíz

Miembro del Comité Asesor de la *International Conference on Virology in the Tropics*. India, 1991.

Manuel Espinosa.

Organizador del EMBO *Workshop "Promiscuous plasmids of gram-positive and -negative bacteria"*. Las Navas del Marqués, Avila, 1992.

Manuel Espinosa, Aldo González y Ricardo B. Maccioni.

Curso de Doctorado Internacional "Nuevas tendencias de la biología celular y molecular: del clonaje al desarrollo y sus implicaciones en la biotecnología". Facultad de Ciencias, Universidad Austral, Chile, 1992.

Antonio de la Hera.

Miembro del Comité Científico del "*5th International Congress on Cell Biology*". Madrid, 1992.

Rosario Gil.

(Presidente), **A. Guinea y S. Serrano** (Comité Organizador), *7th European Conference on Cell and Molecular Biology of Ciliates*. Toledo, 1991.

Aldo González.

Curso de Magister "Biología de los hongos", Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral. Valdivia, Chile, 1991.

Nicolás Jouve y Lucas Sánchez

Curso de Doctorado "Citogenética Molecular" Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, 1991-1992.

Vicente Larraga y Jesús Avila.

Curso en la Universidad internacional Menéndez Pelayo, "Biología Molecular de los Sentidos". Santander, 1991.

Francisco Javier Medina Díaz.

Secretario General del "*5th International Congress on Cell Biology*". Madrid, 1992.

Miembro del Comité Científico. "IV Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular". Valencia, 1991.

Susana Moreno Díaz de la Espina, Ana Mínguez y Mercedes Carnota

Curso de Microscopía Electrónica del Gabinete de Formación del CSIC, 1992.

Flora de Pablo.

Curso de Doctorado "Factores de crecimiento, receptores y mecanismos bioquímicos implicados en la embriogénesis". Programa de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense. Madrid, 1992.

Javier Paz-Ares.

Coorganizador del *Workshop "Flower Development"*. Fundación Juan March, 1991.

Miembro del Comité Organizador "*Eucarpia Symposium on Genetic Manipulation in Plant Breeding: Molecular Biology/Breeding Interfase*". Reus/Salou, Tarragona, 1991.

M^a Carmen Risueño.

Miembro del Comité Científico, V Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular, Valencia, 1991.

Miembro del Comité Organizador, V Congreso Internacional de Biología Celular. Málaga, 1992.

Miembro del Comité Científico, EUREM 92. 1992.

Miembro del Comité Científico, V Congreso Iberoamericano de Biología Celular. 1992.

Luis Rivas

Curso en la Universidad Internacional Menéndez Pelayo "Las Enfermedades Olvidadas: Biología Molecular de los parásitos". Santander, 1991.

Matilde Sánchez Ayuso.

Miembro del Comité Organizador, *IV Portuguese-Spanish Congress of Biochemistry*. Povia do Varzim, Oporto, Portugal, 1991

Miembro del Comité Organizador, *VII Congress of the Panamerican Association of Biochemical Societies*. Ixtapa, Mexico, Septiembre, 1992.

Lucas Sánchez y Begoña Granadino

Curso de Doctorado "Genética del Desarrollo". Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, 1992.

Consuelo de la Torre, y Gonzalo Giménez-Martín

1^{er} Curso de Proliferación Celular y Cáncer. Universidad Autónoma del Estado de Morelos e Instituto Mexicano del Seguro Social. Cuernavaca, México, 1992.

Consuelo de la Torre, Gonzalo Giménez-Martín y Juan Francisco Giménez Abián.

Curso Nacional "Proliferación celular". Universidad Peruana "Cayetano Heredia". Lima, Perú, 1991.

Miguel Vicente.

Miembro del Comité Científico, IV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Biología Celular. Valencia, 1991.

SEMINARIOS DEL CENTRO

1991

Andrew Balrd, The Wittier Institute for Diabetes and Endocrinology, Scripps Memorial Hospital, San Diego, Estados Unidos.

Manuel Benito, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Hermann Bujard, ZMBH, Heidelberg, Alemania.

Pilar Carbonero, ETS de Ingenieros Agrónomos, Madrid, España.

Víctor Calvo, DANA-FARBER Cancer Institute, Boston, Estados Unidos.

Alejandro de Carlos, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

Félix Claverie-Martin, Boston, Massachussetts, Estados Unidos.

Vladimir G. Debabov, Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscú, Rusia.

Maria J. Dzladosz, Nencki Institute of Experimental Biology, Varsovia, Polonia.

Pedro García, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

J.A. García Sanz, Univesity of Miami, Miami, Estados Unidos.

Alfonse Gierl, Max-Planck Institute, Colonia, Alemania.

Myron Goodman, Univerity of Southern California, Los Angeles. Estados Unidos.

Peter Gruss, Max-Planck Institute of Biophysical Chemistry, Göttingen, Alemania.

Fanny Guzmán, Instituto de Inmunología, Hospital S. Juan de Dios, Bogotá, Colombia.

Gerald Holmquist, City of Hope Biology Department, Duarte, California, Estados Unidos.

Roger Hull, John Innes Institute, AFRC, Institute of Plant Science Research, Norwich, Inglaterra.

Nancy Hogg, Imperial Cancer Research Center, Lincon's Inn Field, London, Inglaterra.

W. Kabsch, Max-Planck, Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, Alemania.

Lukas Kühn, ISREC, Lausanne, Suiza.

S.K.A. Law, Oxford University, Oxford, Inglaterra.

Michelle Letarte, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada.

Cathie Martin, John Innes Institute, Norwich, Inglaterra.

Luis Martín Parras, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

Don Mason, MRC, Cellular Immunology Unit, University of Oxford, Oxford, Inglaterra.

John McCarthy, Federal Research Center in Biotechnology, GBF, Braunschweig, Alemania.

Alexander S. Mironov, Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscú, Rusia.

Sergio Moreno, ICRF, Cell Cycle Control Group, Oxford University, Oxford, Inglaterra.

W. Neupert, Institute für Physiologische Chemie, University of Munich, Alemania.

Carol Newlon, New Jersey Medical School, Newark, NJ, Estados Unidos.

Dietrich Nies, Instituto de Fisiología Vegetal y Microbiana, Universidad Libre de Berlín, Berlín, Alemania.

Flora de Pablo, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

Ferdinando Palmieri, Universidad de Bari, Italia.

Eugenia Paton, Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Science, Kiev, Ucrania.

Mark Ptashne, Harvard University, Massachusetts, Estados Unidos.

Ivan Raska, Institute of Experimental Medicine, Czechoslovak Academy of Science, Praga, Checoslovaquia.

José Francisco Rodríguez, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

Trudi Schupbach, Princeton University, New Jersey, Estados Unidos.

J.R. Sokatch, University of Oklahoma, Estados Unidos.

Carlos J. Tandler, CONICET, Instituto de Biología Celular, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

W. Timberlake, Universidad de Georgia, Estados Unidos.

Kenneth N. Timmis, GBF, Braunschweig, Alemania.

1992

Ana Aranda, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid, España.

Jesús Avila, Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid, España.

Ronald Berezney, Department of Biological Science, State University of New York, Buffalo, Estados Unidos.

Luis Blanco Dávila, Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid, España.

Rafael Blasco, Laboratory of Viral Diseases, NIAID, NIH, Estados Unidos.

Harald von Bohemer, Basel Institute for Immunology, Basel, Suiza.

Clement Bordier, Universidad de Los Angeles, Estados Unidos.

Paola Bovolenta, Instituto Cajal, CSIC, Madrid, España.

Hans Jörg Bühring, FACS, Laboratory. Medical University Clinic, Tübingen, Alemania.

Asunción Contreras, Servicio de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal Madrid, España.

Nicole Le Douarin, Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire. CNRS, Nogent-sur-Marne, Francia.

J. Estruch, Max Planck Institut, Colonia, Alemania.

Angel Ezquerro, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España.

Raul Fernández Donoso, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Walter J. Gehring, Biozentrum der Universität, Basel, Suiza.

Kenn Gerdes, Universidad de Odense, Odense, Dinamarca.

Winship Herr, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, Estados Unidos.

M. Hollosi, Eötvös University, Budapest, Rumania.

José Carlos Gutiérrez, Basel Institute for Immunology Basel, Suiza.

Guido Kroemer, Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid, España.

A. M. Kropinski, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada.

John McCarthy, Federal Centre for Biotechnological Research, GBF-Braunschweig, Alemania.

Rosa Magda Alvarado Mallart, INSERM, Paris, Francia.

Diego de Mendoza, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Alessandro Moretta, Istituto de Istologia ed Embriologia Generale, Genova, Italia.

David G. Nicholls, University of Dundee. Inglaterra.

Angela Nieto, Instituto de Neurobiología Ramón y Cajal, CSIC, Madrid, España.

Tokino Okada, President of Okazaki Natinal Research Institute (ONRI), Myodaiji-Cho, Okazaki. Japón.

Emmanuel Pantos, SERC, Daresbury Laboratory, Inglaterra.

Enzo Paoletti, Virogenetics Corporation. Rensselaer Technology Park. Troy, New York, Estados Unidos.

Miguel Angel Peñalva, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid, España.

Friedrich Propst, Ludwig Institute for Cancer Research, Norfolk Place. London, Inglaterra.

Fritz Propst, St. Mary's Hospital Medical School, London , Inglaterra.

Chris Proud, University Walk, Bristol, Inglaterra.

Mariano Rocchi, Universitat di Bari, Italia.

Enrique de la Rosa, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid, España.

Lawrence Rothfield, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut, Estados Unidos.

Katia Ruel, Centre de la Recherche des Macromolecules Vegetales, CERMAV, CNRS, Grenoble, Francia.

Eduardo Santero, Facultad de C. Biológicas, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

Uell Schibler, University of Geneva, Geneva, Suiza..

José Manuel Sogo, ETH, Zurich, Suiza.

Gloria del Solar, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

Nigel K. Spurr, Imperial Cancer Research Fund, Potters Bar, Inglatara.

Joaquín Telxidó, Sección de Inmunología, Hospital de la Princesa, Madrid, España.

Isabel Varela, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid, España.

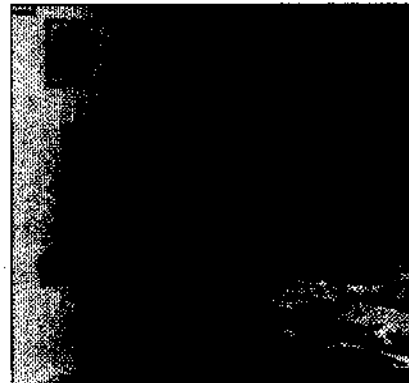
Fernando F. Vargas, National Institutes of Health, Bethesda, Estados Unidos.

Eladio Viñuela, Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid, España.

Eric Wieschaus, Princeton University, Princeton, Estados Unidos.

Moshe Yaniv, Institut Pasteur, París, Francia.

**PERSONAL DE LOS SERVICIOS
DEL CENTRO**



DIRECCION Y GERENCIA

DIRECTOR:

Lucas Sánchez

(Hasta I/1992 y en Funciones Hasta VI/1992).

DIRECTOR EN FUNCIONES:

Manuel Espinosa

(Desde VI/1992)

VICEDIRECTOR:

Augusto Silva

(Hasta VI/1992)

VICEDIRECTOR EN FUNCIONES:

Aldo González

(Desde VI/1992)

GERENTE:

Elena Cuesta.

SECRETARÍA:

Ana Chao

Luis García

4251

ADMINISTRACION

Domingo Arranz Escudero (Jefe de Servicio)

Esther Escribano Arranz
Estrella González Herradura
Reyes Llaguno Pérez

Margarita Fernández García
Natividad Gutiérrez García

ALMACEN Y COMPRAS

Ramón Serrano Coronado (Jefe de Servicio)

Gregorio Bodega Muñoz
Purificación De Chorro de Villaceballos
M^a Teresa Ramos Jiménez

José Cleto Carnero Santas
Manuela Ortiz de Villajos
Ezequiel Toribio Toribio

SERVICIO TECNICO

Antonio García Alvarez (Jefe de Servicio)

Lorenzo Alonso Macarrón
José Cabañas Olivares
José Fernández Fernández
Sebastián Hijosa García
Maria Jesús Montero Rubio
Antonio Pérez Pardo
Juan Miguel Tijero Páramo
Antonio Vallejo Domínguez

4285

Angel Arranz Bombín
Gregorio Cano Martín
Delfín González Hernández
Francisco Javier Manzano López
Angel Pacheco del Olmo
José Santiago Rojo
Manuel Ramón Toro Monsalve
Paloma Velasco de la Roca

SECRETARIAS

Herminia Gutiérrez García
M^a Carmen Partearroyo Lacaba

M^a Victoria Lafita Togoeres
Olvdo Partearroyo Lacaba

CITOFLUORIMETRIA

Pedro Lastres Varo

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Eloy Blanco Marcos
M^a Dolores Guirao Rey

Juana González Arribas
M^a Angeles Ollacarizqueta

MODELADO DE PROTEINAS

Mario García Lacoba

4334

INFORMATICA

José Manuel Angulo Zapater

4334

CULTIVO DE TEJIDOS

Blanca Pérez Maceda
Alejandra Martín Ruiz

FOTOGRAFIA Y DELINEACION

José Blanco Marcos
Aurelio Hurtado Caro

4292

Rosa Díaz López
Ricardo Uña Marín

RADIOACTIVIDAD

Marta Cebrián Echarri

QUIMICA DE PROTEINAS

Javier Varela Espinosa

BIBLIOTECA Y REPROGRAFIA

Evencio Cabrerizo de las Heras 4271
Manuel Fernández Amor
M^a Antonia Hermida González 4298
J. Miguel Soto Estébanez

M^a, Esperanza Cabrero Alonso 4298
Angel Gutiérrez Sanz - 4271
Concepción López Hermida
M^a Jesús Vilela Manrique

CROMATOGRAFIA

Alicia Prieto Orzanco

ANIMALARIO

Diego Díaz Izquierdo
Gabino García Amaya
Manuel Moreno Calle

ESTERILIZACION Y MEDIOS

Matilde Delgado Cebrián
Carmen Díaz Amado Cabanillas

COMEDOR

Julia Anades Besnard - 4283
Encarnacion Sánchez Ruiz
Visitacion Vázquez Vázquez

Enriqueta Arévalo García
Felina Somolinos García

CONSERJERIA Y COMUNICACIONES

**Manuel Arauna Montero
Diego García Herraz
Celia López Adsuara
Lorenzo Montero Vera
Julián Romero Orihuela**

**Florentino Flor Fernández
José M. Gordillo Rodriguez
Julián López Ramirez
Domingo Muriel Muñoz**

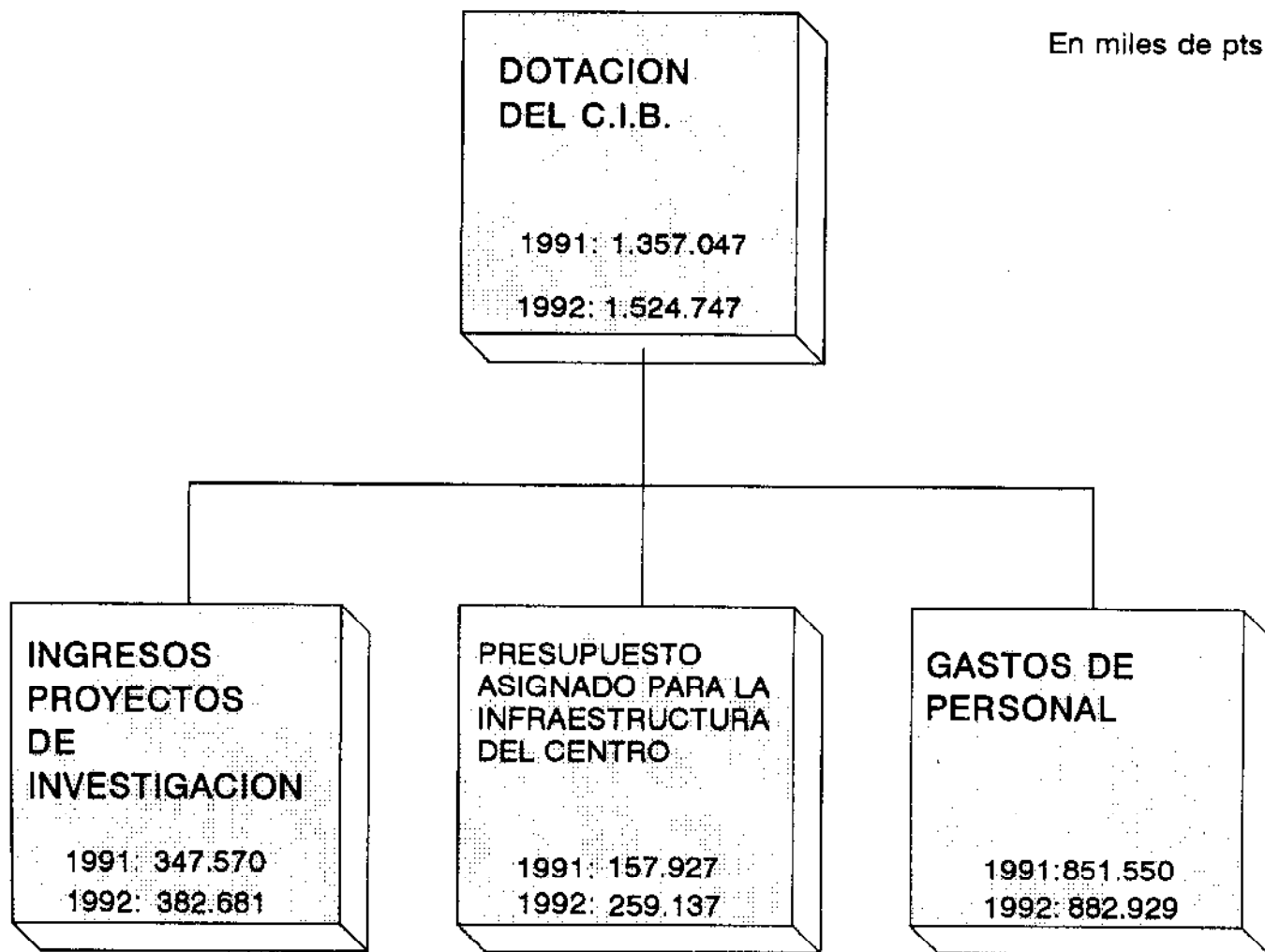
LIMPIEZA DE MATERIAL Y LAVANDERIA

**Elisa Ballesteros Villamayor
Juana Encabo de Blas
Sala Fuentes Romero
María Jiménez Contreras
Carmen López Castellanos
Isabel López Romera
Bárbara Moreno Jiménez
Soledad Pastor Encabo
Francisca Valle Rubio**

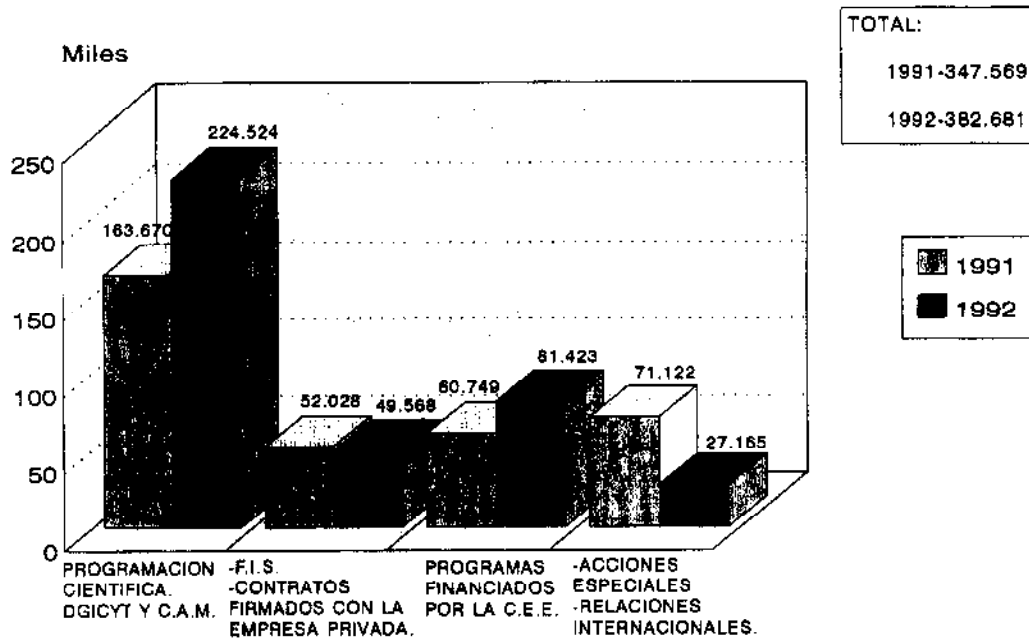
**Blasa Carrion Fernández
Purificación Fernández Ortiz
Remedios Galán Iglesias
Felicidad Lara Martínez
María López Ramírez
Luisa Meseguer Fabregat
Piedad Otazo Castromonte
Carmen Pérez Macarrón**

RESUMEN DE DATOS ECONOMICOS

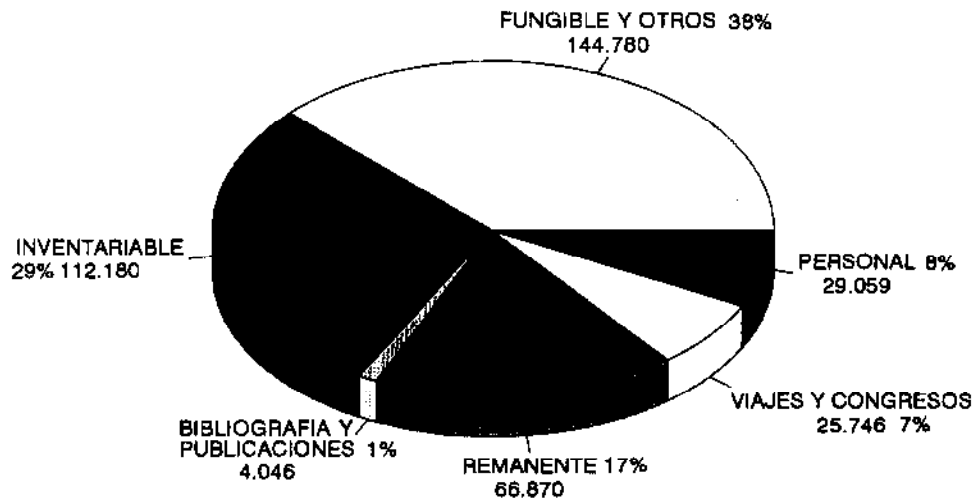
El presupuesto total de funcionamiento del CIB en el año 1992 ha presentado un notable incremento en todas las partidas presupuestarias respecto a 1991. Como se observa en los gráficos, el capital invertido para 1992 ha ascendido a 1.524.749.083 pts. De esta cantidad, un 57% ha correspondido a gastos de personal, un 26% ha correspondido a dotación por proyectos, cursos temáticos y acciones especiales y un 17% a los ingresos obtenidos para infraestructura del Centro.



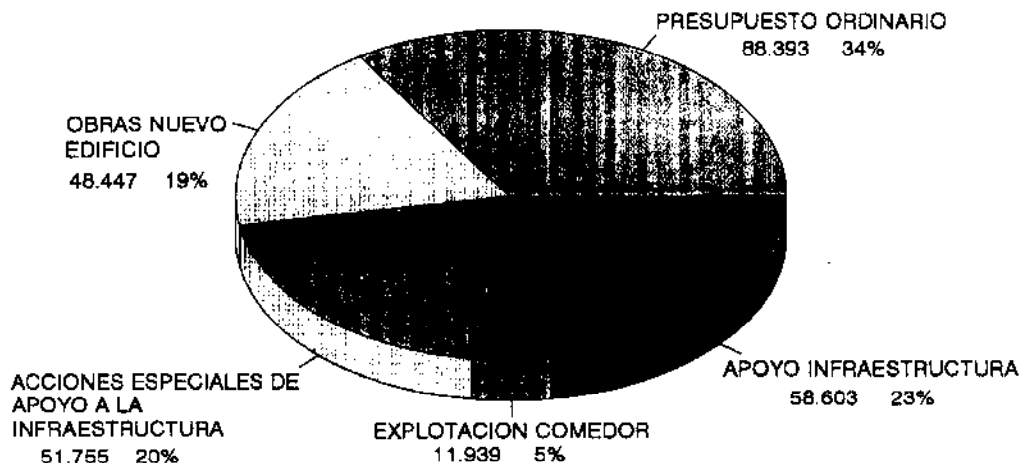
Dotaciones a Proyectos



DESGLOSE DE LOS GASTOS DE PROYECTOS EN 1992



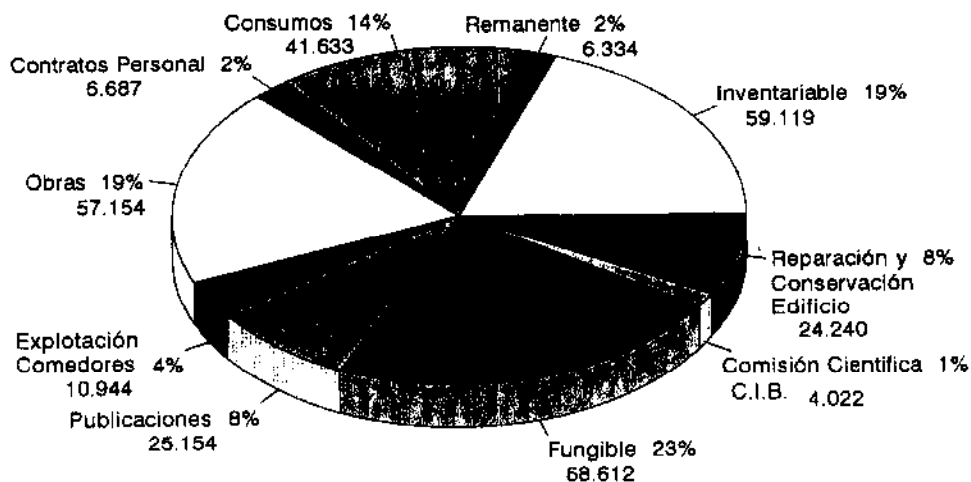
DESGLOSE DEL PRESUPUESTO ASIGNADO PARA LA INFRAESTRUCTURA DEL CENTRO 1992



En miles de pts.

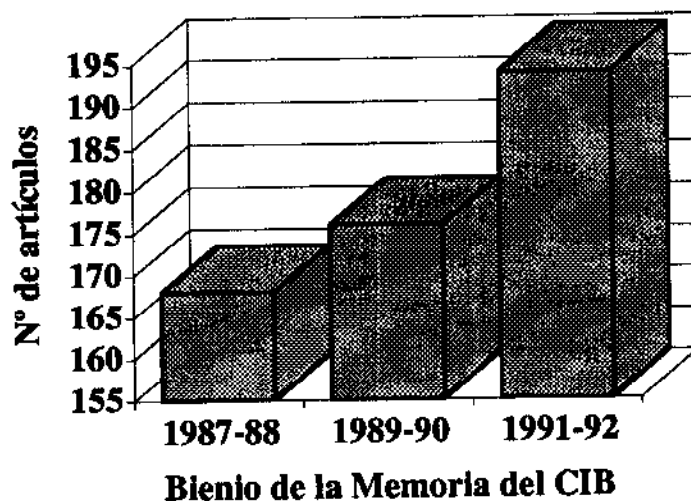
Desglose de Gastos de Servicios por Conceptos

En miles de pts.

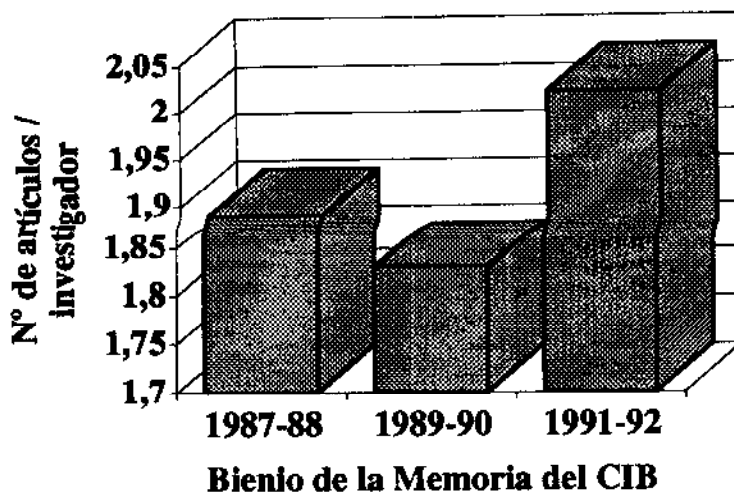


EVOLUCION DEL NUMERO DE PUBLICACIONES Y SU IMPACTO

Evolución del número de artículos en el SCI* por bienio

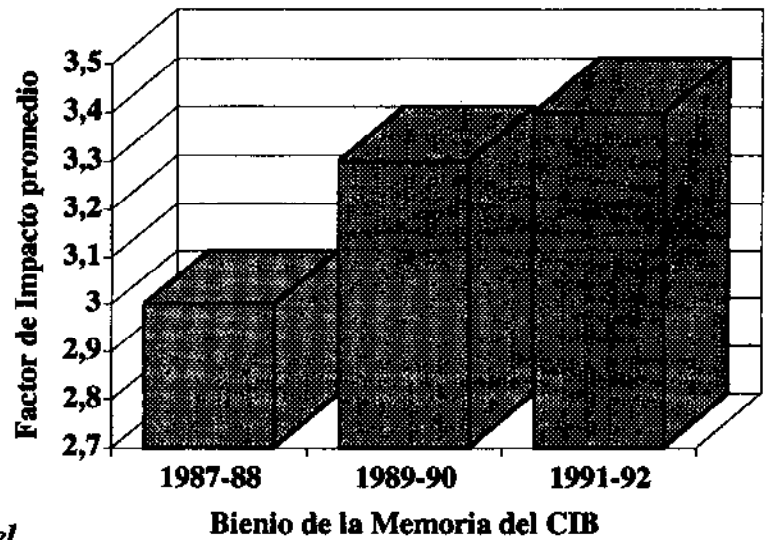


Evolución del número de artículos en el SCI por Investigador

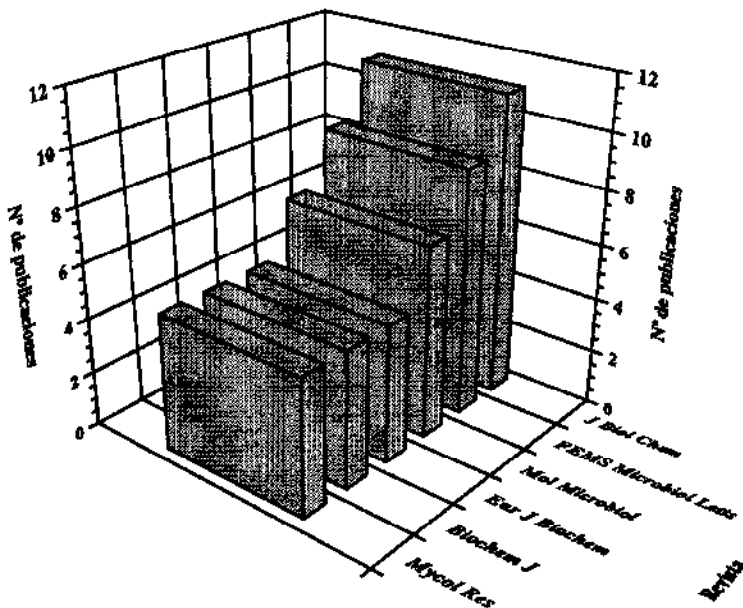


*SCI= Science Citation Index

Evolución del Factor de Impacto



Revistas en las que los investigadores del CIB publican mas frecuentemente (1991 - 1992)



INDICE DE INVESTIGADORES EN PLANTILLA

Nombre	Escala	Teléfono	Pag.
•-Abrisqueta Zarrabe, J. Antonio	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1968)	562030724
-Alonso Sanjuán, Pilar	Investigadora C.	(Dra. C. Naturales, 1959)	585535224
•-Aller Tresguerres, Patricio	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1979)	424741
•-Andreu Morales, J. Manuel	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1976)	438170
•-Aparicio Alonso, Pedro J.	Profesor I.	(Dr. Farmacia, 1971)	436374
•-Barasoain Blasco, Isabel	Colaborador C.	(Dra. C. Biológicas, 1976)	421626
-Beltrá Martínez, Ramona	Investigadora C.	(Dra. Farmacia, 1955)	4419110
•-Bernabéu Quirante, Carmelo	Investigador C.	(Dr. C. Químicas, 1977)	424618
•-Botella Cubells, M ^a Luisa	Colaborador C.	(Dra. C. Biológicas, 1981)	431858
•-Cánovas Palacio-Valdés, José L.	Profesor I.	(Dr. Farmacia, 1964)	422764
•-Casado Moragón, Angela	Colaborador C.	(Dra. C. Biológicas, 1962)	4219152
•-Castañera Domínguez, Pedro	Profesor I.	(Dr. Ing. Agrónomo, 1981)	4264112
•-Castresana Fernández, Carmen	Colaborador C.	(Dra. C. Biológicas, 1984)	4401118
•-De La Hera Martínez, Antonio	Colaborador C.	(Dr. Medicina, 1986)	439415
•-De La Torre García Quintana, Consuelo.	Profesor I.	(Dra. Farmacia, 1969)	430764
•-De Lorenzo Prieto, Víctor	Colaborador C.	(Dr. C. Químicas, 1983)	424392
•-De Pablo Dávila, Flora	Investigadora C.	(Dra. Medicina, 1979)	436050
•-De Torrontegui y Pico De Coaña, Gertrudis	Investigadora C.	(Dra. Ciencias, 1963)	434883
•-Del Mazo Martínez, Jesus	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1978)	432448
•-Díaz Orejas, Ramón	Investigador C.	(Dr. C. Químicas, 1976)	435183
•-Díaz Ruiz, J. Ramón	Profesor I.	(Dr. Farmacia, 1971)	4406121
•-Espinosa Padrón, Manuel	Profesor I.	(Dr. Ciencias, 1969)	420986
•-Esponda Fernández, Pedro	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1979)	433646
•-Fernández Gómez, M ^a Encarnación	Investigadora C.	(Dra. C. Químicas, 1966)	4257123
•-Fernández Tresguerres, M ^a Elena	Colaboradora C.	(Dra. Farmacia, 1971)	435383
-García Fernández, M ^a Carmen	Colaboradora C.	(Dra. C. Químicas, 1962)	..
-García González, Pedro	Colaborador C.	(Dr. C. Químicas, 1982)	442899
•-García Hermida, Ofelia	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1975)	435539
•-García López, Ernesto	Profesor I.	(Dr. C. Biológicas, 1974)	442899
•-García López, José Luis	Investigador C.	(Dr. C. Químicas, 1980)	441899
•-García Luque, Isabel	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1983)	4410121
•-García Mendoza, Concepción	Investigadora C.	(Dra. Farmacia, 1964)	4262128
•-García Pardo, Angeles	Colaboradora C.	(Dra. C. Químicas, 1976)	443031
•-Gil Fernández, Carmen	Investigadora C.	(Dra. C. Biológicas, 1963)	4389157
•-Giménez Gallego, Guillermo	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1977)	437867
•-Goday Baylina, Clara	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1980)	431461
•-Gómez Alarcón, Gonzalo	Colaborador C.	(Dr. Farmacia, 1976)	4269104

Nombre	Escala	Teléfono	Pag.
• -González Becerra, Aldo	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1986)	4414134
• -González Fernández, Aurora	Investigadora C.	(Dra. C. Biológicas, 1964)	430564
• -Gutiérrez Martín, Carmen	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1988)	4272112
• -Gutiérrez Rueda, Carmen	Colaboradora C.	(Dra. Farmacia, 1962)	4386161
• -Hernández Valenzuela, Pablo	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1984)	423253
• -Jareño Cañada, M ^a Asunción	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1968)	4395155
• -Krimmer Smunis, Dora Beatriz	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1979)	423853
• -Larraga De Vera, Vicente	Profesor I.	(Dr. C. Biológicas, 1974)	420780
• -Leal Ojeda, J. Antonio	Investigador C.	(Dr. Farmacia, 1965)	4437130
• -López Abella, Dionisio	Profesor I.	(Dr. C. Biológicas, 1977)	4404121
• -López García, Paloma	Investigadora C.	(Dra. C. Biológicas, 1978)	420389
• -López García, Rubens	Profesor I.	(Dr. C. Biológicas, 1966)	442899
• -Marquet Espinosa, Alberto	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1974)	424580
• -Martín González, Antonio	Investigador C.	(Dr. C. Químicas, 1966)	4436150
• -Martín Requero, M ^a Angeles	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1978)	422436
• -Martínez Ferrer, Angel T.	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1976)	4407134
• -Martínez Hernández, M ^a Jesús	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1980)	4439132
• -Medina Díaz, F. Javier	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1979)	4261123
• -Mollinedo García, Faustino	Investigador C.	(Dr. C. Químicas, 1982)	427411
• -Moreno Díaz De La Espina, Susana	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1975)	4257123
• -Novaes Ledieu, Monique	Investigadora C.	(Dra. C. Físicas, 1961)	4262128
• -Parrilla Sánchez, Roberto	Profesor I.	(Dr. Medicina, 1968)	422536
• -Paez Abril, Eduardo	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1981)	4387157
• -Paz-Ares Rodríguez, F. Javier	Investigador C.	(Dr. Ing. Agrónomo, 1984)	4214142
• -Peñalva Soto, Miguel A.	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1982)	4358107
• -Pérez Silva, Gonzalo	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1966)	..
• -Pérez Ureña, M ^a Teresa	Investigadora C.	(Dra. Farmacia, 1961)	421086
• -Ramírez De Verger, Juan M.	Profesor I.	(Dr. C. Químicas, 1965)	436976
• -Reyes Ramírez, Fuensanta	Investigadora C.	(Dra. C. Químicas, 1964)	4441132
• -Rial Zueco, Eduardo	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1984)	433678
• -Risueño Almeida, M ^a Carmen.	Investigadora C.	(Dra. C. Biológicas, 1967)	4230146
• -Rivas López, Luis	Colaborador C.	(Dr. C. Químicas, 1984)	423480
• -Robles Chillida, Elías M.	Colaborador C.	(Dr. Farmacia, 1969)	4275114
• -Rodríguez De Córdoba, Santiago	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1981)	443221
• -Rodríguez Murcia, Carlos	Investigador C.	(Dr. Veterinaria, 1962)	562762228
• -Rojo Hernández, José M ^a	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1978)	421734
• -Ronda Laín, Concepción	Investigadora C.	(Dra. C. Biológicas, 1970)	442699
• -Sánchez Ayuso, Matilde	Investigadora C.	(Dra. C. Químicas, 1969)	422536
• -Sánchez Rodríguez, Lucas	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1976)	432255
• -Sánchez Serrano, José J.	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1982)	4212116
• -Schvartzman Blinder, Bernardo	Colaborador C.	(Dr. Ing. Agrónomo, 1978)	423356

Nombre	Escala	Teléfono	Pag.
• -Silva González, Augusto	Colaborador C. (Dr. C. Biológicas, 1981)	4431	28
-Teixidó Calvo, Joaquín	Colaborador C. (Dr. C. Biológicas, 1985)	4023347	
• -Torroja Cabanillas, Eduardo	Investigador C. (Dr. C. Biológicas, 1962)	4323	55
• -Vicente Muñoz, Miguel	Investigador C. (Dr. C. Biológicas, 1972)	4375	96
• -Vidal Caballero, Miguel A.	Colaborador C. (Dr. C. Biológicas, 1984)	4382	44
-Vilas Minondo, Pilar	Investigadora C. (Dra. Farmacia , 1964)	4391	161

(NOTA: El listado telefónico incluye los cuatro dígitos de la extensión cuando se marca la centralita del CIB, 564-45-62, salvo líneas directas indicadas por siete dígitos).



CIB. Velázquez 144 • 28006 MADRID