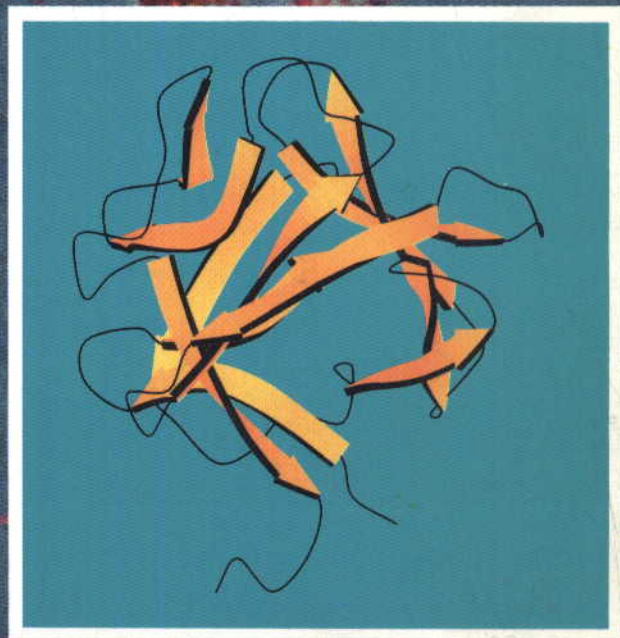


**CENTRO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
1993-1994**



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS. MEMORIA 1993-1994

Erratas / *Erratum*

Título de página 163

*Title in page 163*

**Carbohidratos Bacterianos**  
*Microbial Carbohydrates*

**Memoria Científica 1993-1994**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS**



**CSIC**

---

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

Cubierta

Cover

**Fondo:** La neuroretina de embrión de pollo expresa mRNA (granos rosa) de la proteína de unión de IGFs, IGFBP5 en la capa nuclear interna y en las células ganglionares (fotografía de E. J. de la Rosa *et al.*, ver memoria en pág. 43).

**Recuadro:** Diagrama de la estructura en disolución del factor ácido de crecimiento para fibroblastos (aFGF), activado por heparina (Pineda *et al.* *J. Mol. Biol.* 242, 81-98, 1994, ver memoria de G. Giménez *et al.*, pág. 80).

**Background:** *Chick embryo neuroretina expresses mRNA (positive grains are pink) for the IGFs binding protein IGFBP5 in the internal nuclear layer and the ganglion cells (photograph from E. J. de la Rosa et al., see report in page 43).*

**Insert:** *Diagram of the solution structure of acidic fibroblast growth factor (aFGF), activated by heparine (Pineda et al. *J. Mol. Biol.* 242, 81-98, 1994, see report of G. Giménez et al. in page 80).*

Coordinación Editorial: FLORA DE PABLO  
JOSÉ LUIS CÁNOVAS

Diseño: Studio MV

Secretaría: M. VICTORIA LAPITA

Fotografías del Centro: ERINIA

Maquetación y filmación: Fotocomposición Mafirh, S. L. Tel.: 403 94 30

Imprime: Serit, S. A., Artes Gráficas. Tel.: 304 04 43/52. MADRID

# TABLA DE CONTENIDOS

	<u>Pág.</u>
- <b>Recuerdos del CIB (Dr. Mariano Barbacid)</b> .....	5
- <b>Comentarios de la Dirección</b> .....	9
<b>RESUMEN DE LA ACTIVIDAD INVESTIGADORA DE LOS GRUPOS</b>	
- <b>Dpto. de Biología Celular y del Desarrollo</b> .....	11
Control Genético del Ciclo Celular .....	12
Biología Molecular de los Cromosomas Eucarióticos .....	15
Reproducción Celular .....	18
Proliferación y Diferenciación de Células Mieloides .....	21
Regulación de la Expresión de Genes Eucariotas .....	24
Control Transcripcional en Eucariotas .....	27
Biología Celular y del Desarrollo de Nematodos .....	30
Citogenética Molecular de Dípteros .....	32
Biología del Desarrollo de <i>Drosophila</i> .....	35
Genética y Dinámica de Zonas Híbridas .....	37
Biología Molecular de la Gametogénesis .....	38
Biología de la Reproducción .....	41
Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados .....	43
- <b>Dpto. de Biología de Plantas</b> .....	47
Biología Celular y Molecular Vegetal .....	48
Bilología Molecular de Plantas .....	53
Biología Molecular de la Resistencia Vegetal .....	55
Entomología Relación Planta-Insecto .....	58
Genética Molecular de Plantas .....	61
Mecanismos de Resistencia Inducida en Plantas .....	63
Organización Nuclear Durante el Desarrollo de Plantas .....	64
Quimiorrecepción en Insectos .....	69
Virología Molecular de Plantas .....	71
- <b>Dpto. de Estructura y Función de Proteínas</b> .....	77
Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores .....	78
Biología Estructural y Funcional de Factores Endoteliales Vasoactivos .....	80
Biología Molecular de Bacterias Gram-positivas .....	84
Bioquímica de <i>Leishmania</i> . Péptidos Eucarióticos con Función Antibiótica .....	88
Estructura e Interacciones de las Proteínas de los Microtúbulos .....	91
Expresión de Antígenos de <i>Leishmania</i> .....	96
Fotobioquímica Vegetal .....	98
Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-positivas .....	100

	<u>Pág.</u>
<b>- Dpto. de Fisiopatología y Genética Humana</b> .....	105
Estructuras Celulares .....	106
Fijación Directa del N <sub>2</sub> .....	107
Genética Humana.....	108
Hormonas y Neuropeptidos del Eje Entero-Insular.....	110
Marcadores Tumorales y Procesos de Envejecimiento .....	112
Metabolismo y Patología Molecular .....	115
Microbiología Aplicada .....	118
<b>- Dpto. de Inmunología</b> .....	121
Activación de Linfocitos T.....	122
Adhesión Celular en el Sistema Inmune .....	125
Biología Celular de las Moléculas de Adhesión .....	128
Diferenciación de Linfocitos Humanos .....	131
Diferenciación Macrofágica y Receptores de Membrana.....	134
Epítotos Funcionales de Proteínas de Superficie Celular y Citoesqueleto.....	138
Genética del Complemento .....	141
Receptores de Citoquinas .....	144
Transducción de Señales y Biología Leucocitaria.....	148
Virología Molecular.....	150
<b>- Dpto. de Microbiología Molecular</b> .....	153
Biodegradación de la Lignina .....	154
Bioquímica de Hongos .....	158
<i>Birnavirus</i> , <i>Lyssavirus</i> y <i>Aeromonas</i> Patógenos en Acuicultura .....	160
Carbohidratos Bacterianos .....	163
Fisiología y Bioquímica de Hongos Filamentosos.....	166
Genética Bacteriana .....	168
Genética Molecular de <i>Aspergillus</i> .....	173
Genética Molecular de <i>Pseudomonas</i> .....	176
Replicación y Mantenimiento de Plásmidos Bacterianos.....	180
Transformación de la Lignocelulosa por Microorganismos y sus Implicaciones Biotecnológicas.....	184
<b>- Vectores CEDIG</b> .....	188
<b>- Premios y distinciones</b> .....	190
<b>- Organización de Congresos y Cursos</b> .....	191
<b>- Seminarios del Centro</b> .....	193
<b>- Personal de los Servicios del Centro</b> .....	199
<b>- Jubilaciones y nuevas incorporaciones</b> .....	202
<b>- Resumen de datos económicos</b> .....	203
<b>- Evolución del número de publicaciones y su impacto</b> .....	205
<b>- Índice alfabético de investigadores y lista de teléfonos</b> .....	207

## RECUERDOS DEL CIB

### MARIANO BARBACID

Instituto de Investigación  
Bristol-Myers Squibb  
Princeton, New Jersey, EEUU

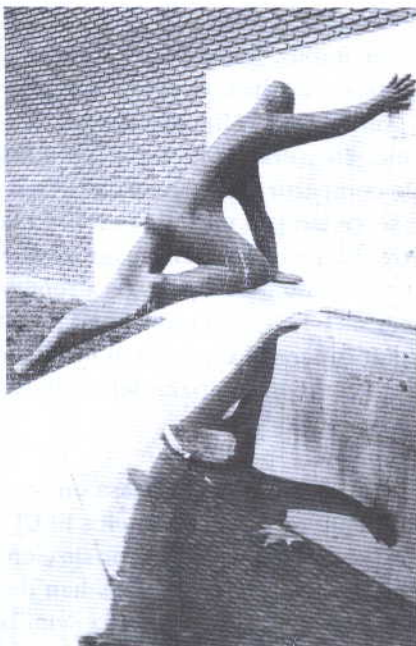


Foto: ERINIA

Mi paso por el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) fue breve, poco más de tres años. Sin embargo, ha sido la etapa que más influencia ha ejercido sobre mi carrera profesional. Por ello guardo con gran cariño mis recuerdos del CIB y agradezco esta oportunidad de poder compartirlos con vosotros. Llegué a la «Casa» en Enero de 1971 cuando compaginaba mis obligaciones como estudiante de 5º año de Ciencias Químicas con las de cabo segundo del Ejército del Aire. Tan solo unos meses antes había tomado la decisión de irme a investigar al extranjero nada más acabar la carrera, aunque he de confesar que en aquel momento no tenía ni idea de cómo hacerlo. Lo único que tenía claro es que la Universidad de 1971 no era, ni mucho menos, el sitio idóneo donde iniciar mis inquietudes científicas.

Al poco de empezar el curso, mi amigo Ángel Pascual, conocedor de mi interés por la investigación, me comentó que había un Centro en el «Consejo» donde podía interesarme hacer la Tesis Doctoral. Con una gran dosis de escepticismo me acerqué una tarde a Velázquez 144 pensando que en el mejor de los casos, podría hacer allí la tesina y «desbravarme» un poco antes de salir al extranjero. Mi primera sorpresa fue la amabilidad con que me recibió José Avelino Pérez-Geijo. Acostumbrado al trato que se dispensaba al estudiante en la Universidad, aquello me pareció otro mundo. Y lo era. Geijo (como se le conocía en el CIB) me dio una Memoria y al ojearla pude ver que allí había grupos que publicaban frecuentemente en revistas internacionales de máximo prestigio.

A los pocos días volví a ver a Geijo, una vez me convencí de que en realidad era posible hacer una buena Tesis Doctoral en España. De todo lo que leí en aquella Memoria, mi proyecto favorito fue un trabajo sobre transcripción en  $\Phi 29$  que se hacía en el laboratorio de Margarita Salas. Al no tener sitio Margarita, me decanté por el laboratorio de David Vázquez. Por aquel entonces no sabía mucho sobre síntesis de proteínas pero me impresionó el récord de publicaciones de aquel grupo. Tal y como he indicado al comienzo de estos Recuerdos, considero mi estancia en el laboratorio de David como la etapa más importante y definitiva de mi carrera, ya que la orientó en la dirección idónea. David me enseñó como plantear un problema científico y como resolverlo. En su laboratorio aprendí a diseñar experimentos de tal forma que se pudiera obtener el máximo de información con el mínimo de ambigüedades. En fin, con David aprendí a investigar.

Independientemente de la huella que imprimió David en mí, tanto como investigador como persona, no sería justo olvidar la influencia que ejercieron otros muchos investigadores y compañeros de Tesis. David había sabido atraer a científicos jóvenes ya formados en el extranjero como Joan Modolell, Juan Pedro García Ballesta y más tarde, Antonio Jiménez, que jugaron un papel muy importante en mi formación científica. Siempre recordaré de Joan, además de sus consejos científicos, el amor y respeto con que trataba los instrumentos, conceptos que trato de

inculcar —no siempre con éxito— en mis “postdocs”. No menos importante para mi formación fue la presencia en el laboratorio de Becarios a punto de terminar su Tesis Doctoral como Enrique Battaner, María Luisa Celma y, sobre todo, Rafael Fernández Muñoz de quien aprendí muchas de las técnicas y conceptos que me sirvieron para hacer mi Tesis.

En aquella época, el CIB era un hervidero de actividad científica. Alberto Sols, Carlos Asensio, Eladio Viñuela, Margarita Salas, Antonio García Bellido, Emilio Muñoz, José Luis Cánovas, Gabriella Morreale y tantos otros, formaban un núcleo de auténtica calidad científica. De hecho, no he conocido otro entorno donde hubiera más ilusión y ganas de trabajar que en el CIB de aquella época. Jesús Ávila, Alfredo Toraño, Ignacio Sandoval, Juan Ortín, Víctor Rubio, José Miguel Hermoso, Vicente Larraga, Alberto Marquet, Luis Carrasco, Lucas Sánchez, Ginés Morata, Ángel Pellicer, Manuel Perucho, Manuel Espinosa, Ana Aranda, Miguel Vicente, Guillermo Giménez, Nazario Rubio, Pepe Borrell, etc. etc., eran sólo algunos de los muchos doctorandos con quien tuve la fortuna de compartir mi estancia en la Casa. Quizás fueran las circunstancias especiales que se vivían por entonces en España las que hicieron tan especial aquella época. Hoy día resulta difícil imaginar que toda una promoción de Becarios de primer año estuviéramos dispuestos a renunciar a nuestras Becas, nuestra única vía para hacer una Tesis Doctoral, si no se les prorrogaban las ayudas a los Becarios de cuarto año para que pudieran terminar la suya. Esta experiencia fue dura, pero al mismo tiempo sirvió para definir la calidad humana de los que componíamos el CIB en aquella época.

Tras defender mi Tesis Doctoral en Febrero de 1974, abandoné la Casa en Septiembre de ese mismo año para hacer mi entrenamiento postdoctoral en los EEUU. Desde entonces he procurado mantener el máximo contacto con ese grupo de científicos que tanto influyó en mi formación investigadora. Muchos de ellos han dejado el CIB en busca de otras oportunidades. De hecho el CIB ha sido la semilla de muchos de los Centros de Investigación más punteros de nuestro país como el Centro de Biología Molecular, el Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Cajal. A su vez, el CIB se sigue nutriendo de savia nueva que asegura la continuidad de una calidad científica en consonancia con la tradición histórica de esta Institución. Es mi deseo que las nuevas generaciones de Becarios guarden de su paso por el CIB los mismos gratos recuerdos que yo tengo.



## MEMORIES OF THE CIB

---

**MARIANO BARBACID**

Bristol-Myers Squibb

Pharmaceutical Research Institute

Princeton, New Jersey, USA.

---

*I only spent three years at the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). However, I consider this period of time as the most important of my research career, a circumstance that may help to explain why I have such wonderful memories of my stay at the CIB. I am thankful for allowing me this opportunity to share them with you. I arrived at the CIB (colloquially known as the "House") in January of 1971 when I was juggling my senior year in Chemistry with my duties as a corporal in the Spanish Air Force. A few months earlier, I had made the firm decision to go abroad to initiate my career as a scientist right after finishing college. I must confess, I didn't know how to do it. However, it was obvious to me that the University did not offer, at that time, the most adequate environment to carry out my research goals.*

*At the beginning of my senior year, my friend Ángel Pascual, knowing my interest for basic research, told me about an Institute within the Spanish Research Council where, according to him, I could carry out my graduate studies. Rather skeptical, I went to the CIB located in Velázquez 144, hoping that at least I could do a short Masters Thesis that would allow me to gain some research experience before going abroad. Being used to the little attention that the University gave to students in those days, I was pleasantly surprised by the kind welcome that I received from the Director of the CIB, Dr. Jose Avelino Pérez-Geijo. Dr. Geijo gave me an Annual Report in which to my surprise, I found out that several research groups had publications in some of the most prestigious international journals.*

*A few days later, I returned to the CIB convinced that it was possible to do a good Doctoral Thesis in Spain. Of all the projects described in that Annual Report, work on the transcriptional mechanisms of bacteriophage  $\Phi$ 29 caught my eye. Unfortunately, the Director of that project, Dr. Margarita Salas (one of the pioneers of molecular biology in Spain) did not have an opening in her laboratory. As my second choice, I selected the laboratory of Dr. David Vázquez (a world leader in the field of antibiotics and protein synthesis). At that time, I knew very little about protein synthesis, but I was impressed by his publications record. As I indicated above, my stay in David's laboratory was the most important period of my career as a scientist since steered my research goals in the right direction. David taught me how to define a relevant scientific question and how to resolve it. He also showed me how to address scientific problems in the most direct and productive fashion. In summary, David taught me how to do basic research.*

*In addition to the teachings I received from David, I must also acknowledge the influence that other members of his laboratory had during my graduate training. At that time, David had attracted several young scientists that had already trained in the USA and the UK. These scientists, Joan Modolell, Juan Pedro García Ballesta and Antonio Jiménez, played a very important role in my development as a scientist. I will always remember the care and respect that Joan had for all the equip-*

*ment, a concept that today I still try to convey, not always successfully, to my post-docs. The presence in David's laboratory of three senior graduate students, Enrique Balaner, María Luisa Celma and Rafael Fernández Muñoz, also played a critical role in my development as a scientist. In particular, I am indebted to Rafael Fernández Muñoz who taught me many of the techniques and conceptual theory needed to carry out my Doctoral Thesis.*

*At that time, the CIB was a hub of scientific activity. Drs. Alberto Sols, Carlos Asensio, Eladio Viñuela, Margarita Salas, Antonio García Bellido, Emilio Muñoz, Jose Luis Cánovas, Gabriella Morreale and so many others provided a superb research environment. Indeed, I have never encountered any other institution where students and faculty worked together with such intensity and dedication. Jesús Ávila, Alfredo Torano, Ignacio Sandoval, Juan Ortín, Victor Rubio, José Miguel Hermoso, Vicente Larraga, Alberto Marquet, Luis Carrasco, Lucas Sánchez, Ginés Morata, Angel Pellicer, Manuel Perucho, Manuel Espinosa, Ana Aranda, Miguel Vicente, Guillermo Giménez, Nazario Rubio, Pepe Borrell etc. etc., are just some of the graduate students with whom I had the privilege to share my tenure at the CIB. Undoubtedly, it was a very special time, not only for the CIB, but for the entire Spanish society. Today, it is hard to imagine how many of us, that so vehemently wanted to carry out basic research, were willing to relinquish our Fellowships unless the Ministry of Education did extend its support to fourth year graduate students so they could finish their Doctoral Thesis. This was a difficult and trying experience and in retrospect, a rather daring attitude. However, it was worthy since it showed the true character of many of those who worked at the CIB at that time.*

*After defending my Thesis in February of 1974, I left the "House" in September to carry out my postdoctoral training in the USA. Since then, I have made every possible effort to maintain contact with those CIB scientists that I befriended during my graduate work. Many of them have left the CIB in search of other opportunities. Indeed, the CIB has been the seed for some of the best Research Institutions in Spain such as the Centro de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas and Instituto Cajal. At the same time, the CIB has continued attracting new scientists that have maintained its long tradition as a superb Research Center. I sincerely hope that the new generations of graduate students have the same wonderful memories as I do.*

# COMENTARIOS DE LA DIRECCIÓN *COMMENTS OF THE DIRECTOR*

---

**GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO**

Director

---

A comienzos del pasado mes de noviembre tuve el honor de presentar en un acto presidido por el Excmo. Sr. Secretario de Estado para Universidades e Investigación y el Presidente del Consejo Superior de investigaciones Científicas el Catálogo de Publicaciones del Profesor Gregorio Marañón existentes en los fondos de la Biblioteca del Centro de Investigaciones Biológicas, un trabajo de biblioteconomía fruto de la dedicación y altruismo del equipo de bibliotecarias del centro. Para hacer dicha presentación no tuve más remedio que tratar de informarme sobre la personalidad del Dr. Marañón y sobre su relación con el Centro de Investigaciones Biológicas. En seguida caí en la cuenta de que estudiar esta relación era adentrarse en los orígenes de la investigación biomédica actual, uno de los campos científicos en que la voz de España goza de prestigio fuera de nuestras fronteras.

La proyección internacional de la investigación biomédica de nuestro país arranca sin ninguna duda de D. Santiago Ramón y Cajal que reúne a un selecto grupo de discípulos en el primer edificio del Instituto Cajal, en Atocha. Ellos asimilan su espíritu y se entregan con entusiasmo a poner nuestra investigación biológica y médica al ritmo de la que se desarrolla en los países punteros de la época. Por desgracia, este impulso regenerador tuvo que soportar el profundo impacto traumático de la guerra civil, justo cuando su principal motor, Santiago Ramón y Cajal, acababa de morir. El aislamiento internacional, el exilio, la desaparición de instituciones puso en trance de muerte a la investigación biomédica española. Sin embargo, a pesar de este cúmulo de adversidades pervivió y se desarrolló. Y en este resurgir, el Prof. Gregorio Marañón desempeñó un papel clave. El Dr. Marañón entrevió que la pervivencia de la investigación biomédica en España requería en aquel momento que los grupos que aun subsistían unieran sus fuerzas y así adquirieran peso específico ante la sociedad española. De ahí surgió la idea de planear un nuevo edificio que concentrara la investigación biológica en el campus del Consejo. En un solar obtenido por permuta con el Instituto Cajal nace el Centro de Investigaciones Biológicas al que, de forma consciente o no, sus fundadores hacen heredar parte del nombre del laboratorio de don Santiago: el laboratorio de Investigaciones Biológicas. A la fundación del Centro de Investigaciones Biológicas dedicó el Prof. Marañón una gran parte de sus esfuerzos en los últimos años de su vida. En su discurso inaugural, en febrero de 1958,

ya casi un testamento, pues iba a morir dos años después, D. Gregorio hace depositario al Centro de Investigaciones Biológicas de las inquietudes de regeneración científica que el había heredado de D. Santiago Ramón y Cajal. El quiere al Centro a la vez laboratorio de excelencia y foco de irradiación desde el que se pusiera en marcha la regeneración de la investigación Biomédica en España.

Desde la perspectiva que nos otorgan ya treinta y seis años de historia de la institución se puede afirmar que, sin poder obviar las miserias que acompañan a todo lo humano, el Centro de Investigaciones Biológicas ha cumplido la misión que se le encomendó. A él pertenecen o han pertenecido en alguna época de su vida una gran parte de las figuras más señeras de la investigación biomédica española de esas últimas décadas. Del actual Centro de Investigaciones Biológicas se desgajaron progresivamente el Instituto de Biología Vegetal de Sevilla, el Instituto de Microbiología Molecular de Salamanca, el Centro de Investigaciones Biomédicas de Madrid, el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, el Instituto de Neurobiología Ramón y Cajal, y una parte importante del Departamento de Biología Vegetal del Centro Nacional de Biotecnología. Sin embargo, a pesar de la sangría continua de investigadores que ha supuesto la puesta en marcha de todos estos nuevos laboratorios, el Centro de Investigaciones Biológicas ha seguido manteniendo un alto nivel de producción científica. A lo largo de los treinta y seis años de existencia del Centro, sus investigadores han publicado unos 3.000 artículos con resultados originales, la mayor parte de ellos en revistas científicas internacionales. Un número de publicaciones que debe ser evaluado en el marco de las condiciones precarias en que se desarrolló la investigación del Centro en sus primeros años, cuando conseguir instrumentación y productos químicos del extranjero era una auténtica heroicidad, el desconocimiento de los idiomas extranjeros, la tónica general del país, y las aportaciones científicas provenientes de España recibidas con recelo.

El impacto en el panorama científico español del Cuarenta y seis del Centro de Investigaciones Biológicas le hace indudablemente una institución céntrica de la historia de la ciencia española, sobre la que tendríamos que volver una y otra vez los historiadores para explicar el desarrollo de la investigación biomédica de nuestro país en este siglo XX. En la actualidad, la misión de regenerar nuestra ciencia que la historia le encomendó puede considerarse ya terminada. Sin embargo, el ser una institución de excelencia sigue siendo un objetivo irrenunciable del Centro de Investigaciones Biológicas. Esta memoria de nuestros trabajos de investigación durante el bienio 1993-1994 resume nuestros esfuerzos por seguir en la brecha que abrieron nuestros predecesores.

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y DEL DESARROLLO**  
**DEPARTMENT OF CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY**

---

Jefe de Departamento <i>Department Head</i>	<b>JORGE BERNARDO SCHVARTZMAN BLINDER</b>
Investigadores / <i>Scientists</i> Profesores de Investigación	<b>JOSÉ LUIS CÁNOVAS PALACIO-VALDÉS</b> <b>CONSUELO DE LA TORRE GARCÍA-QUINTANA</b>
Investigadores Científicos	<b>JOSÉ LUIS DÍEZ CORTES</b> <b>M.<sup>a</sup> AURORA GONZÁLEZ FERNÁNDEZ</b> <b>PEDRO ESPONDA FERNÁNDEZ</b> <b>FLORA DE PABLO DÁVILA</b> <b>LUCAS SÁNCHEZ RODRÍGUEZ</b> <b>EDUARDO TORROJA CAVANILLAS</b> <b>MIGUEL VICENTE MUÑOZ</b>
Colaboradores Científicos	<b>PATRICIO ALLER TRESGUERRES</b> <b>LUISA M.<sup>a</sup> BOTELLA CUBELLS</b> <b>ENRIQUE DE LA ROSA CANO</b> <b>CLARA GODAY BAYLINA</b> <b>PABLO HERNÁNDEZ VALENZUELA</b> <b>DORA BEATRIZ KRIMER SMUNIS</b> <b>JESÚS DEL MAZO MARTÍNEZ</b> <b>JAVIER REY CAMPOS</b> <b>JORGE BERNARDO SCHVARTZMAN BLINDER</b> <b>MIGUEL ÁNGEL VIDAL CABALLERO</b>
Secretaria	<b>M.<sup>a</sup> DEL CARMEN PARTEARROYO LACABA</b>

# Control Genético del Ciclo Celular

## *Genetic Control of the Cell Cycle*

---

**MIGUEL VICENTE**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**TERESA GARRIDO****MANUEL SÁNCHEZ**

**KLAS FLÅRDH** (Desde IV-1994)

B. Postdoctorales

*Postdoctoral Fellows*

**MARÍA JOSÉ FERRÁNDIZ****MANUEL BALLESTEROS**

**ANA MARTÍNEZ** (A tiempo parcial)

**LUCÍA YIM**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**MARÍA ÁNGELES GONZÁLEZ** (1994)

Pregraduado

*Undergraduate Student*

**PILAR PALACIOS**

**MERCEDES CASANOVA** (1993)

Personal Técnico

*Technical Staff*

---

### **El control de la división celular en el tiempo y en el espacio**

#### **Control temporal de la división**

En el ciclo celular de las bacterias existen controles temporales que introducen una discontinuidad periódica cuyo resultado es la división celular. Aunque el crecimiento de la célula es continuo la división no ocurre al azar, sino que está controlada con gran precisión tanto temporal como espacialmente. Hemos sido el primer laboratorio que ha obtenido pruebas a nivel molecular sobre la existencia de un suceso periódico que juega un papel fundamental en el control de la división. El mecanismo se basa en la oscilación de la transcripción del gen *ftsZ* cuyo máximo ocurre una vez por ciclo coincidiendo con la iniciación de la replicación del DNA. El producto del gen *ftsZ* es una proteína, FtsZ, esencial para la división de la mayoría de las eubacterias. Hemos comprobado además que la oscilación es importante para la célula, ya que si se elimina, separando al gen *ftsZ*, de sus señales reguladoras naturales haciendo que se exprese de forma continua, la división no puede ocurrir en su momento normal, la división celular siguiente se retrasa, y las células se hacen más largas.

#### **Arquitectura molecular del sitio de división**

El sitio donde se produce la división se localiza con precisión en el centro de la célula. Se ha propuesto que un grupo de moléculas, el septador, es quien lo

### ***Temporal and spatial control of cell division***

#### ***Timing cell division***

*The bacterial cell cycle is regulated by mechanisms that introduce a periodic discontinuity resulting in cell division. Although cell growth proceeds in a continuous fashion cell division does not occur at random, being precisely controlled in time and space. Our group has been the first to document at the molecular level a periodic event that plays a crucial role in the control of cell division. This mechanism is based on the oscillation of transcription of the *ftsZ* gene which shows a peak once per cycle coinciding with the initiation of DNA replication. FtsZ, the product of the *ftsZ* gene is essential for cell division in most eubacteria. We have also shown that this oscillation is important for the cell because if it is abolished, disconnecting the *ftsZ* gene from its natural regulatory signals so that it is expressed continuously, division cannot occur at the normal time so that the cells are delayed in their subsequent division and become larger.*

#### ***Molecular architecture of the division site***

*The division site is generated precisely at the cell centre. A group of molecules, the septator, has been proposed to be responsible for its formation. Among them are some of the products of genes located in the *dcw* cluster (division and cell wall), a region at minute 2.5 of the *Escherichia coli* chromosome in which a doz-*

# Control Genético del Ciclo Celular

## *Genetic Control of the Cell Cycle*

---

**MIGUEL VICENTE**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**TERESA GARRIDO****MANUEL SÁNCHEZ**

**KLAS FLÅRDH** (Desde IV-1994)

B. Postdoctorales

*Postdoctoral Fellows*

**MARÍA JOSÉ FERRÁNDIZ****MANUEL BALLESTEROS**

**ANA MARTÍNEZ** (A tiempo parcial)

**LUCÍA YIM**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**MARÍA ÁNGELES GONZÁLEZ** (1994)

Pregraduado

*Undergraduate Student*

**PILAR PALACIOS**

**MERCEDES CASANOVA** (1993)

Personal Técnico

*Technical Staff*

---

### **El control de la división celular en el tiempo y en el espacio**

#### **Control temporal de la división**

En el ciclo celular de las bacterias existen controles temporales que introducen una discontinuidad periódica cuyo resultado es la división celular. Aunque el crecimiento de la célula es continuo la división no ocurre al azar, sino que está controlada con gran precisión tanto temporal como espacialmente. Hemos sido el primer laboratorio que ha obtenido pruebas a nivel molecular sobre la existencia de un suceso periódico que juega un papel fundamental en el control de la división. El mecanismo se basa en la oscilación de la transcripción del gen *ftsZ* cuyo máximo ocurre una vez por ciclo coincidiendo con la iniciación de la replicación del DNA. El producto del gen *ftsZ* es una proteína, FtsZ, esencial para la división de la mayoría de las eubacterias. Hemos comprobado además que la oscilación es importante para la célula, ya que si se elimina, separando al gen *ftsZ*, de sus señales reguladoras naturales haciendo que se exprese de forma continua, la división no puede ocurrir en su momento normal, la división celular siguiente se retrasa, y las células se hacen más largas.

#### **Arquitectura molecular del sitio de división**

El sitio donde se produce la división se localiza con precisión en el centro de la célula. Se ha propuesto que un grupo de moléculas, el septador, es quien lo

### ***Temporal and spatial control of cell division***

#### ***Timing cell division***

*The bacterial cell cycle is regulated by mechanisms that introduce a periodic discontinuity resulting in cell division. Although cell growth proceeds in a continuous fashion cell division does not occur at random, being precisely controlled in time and space. Our group has been the first to document at the molecular level a periodic event that plays a crucial role in the control of cell division. This mechanism is based on the oscillation of transcription of the *ftsZ* gene which shows a peak once per cycle coinciding with the initiation of DNA replication. FtsZ, the product of the *ftsZ* gene is essential for cell division in most eubacteria. We have also shown that this oscillation is important for the cell because if it is abolished, disconnecting the *ftsZ* gene from its natural regulatory signals so that it is expressed continuously, division cannot occur at the normal time so that the cells are delayed in their subsequent division and become larger.*

#### ***Molecular architecture of the division site***

*The division site is generated precisely at the cell centre. A group of molecules, the septator, has been proposed to be responsible for its formation. Among them are some of the products of genes located in the *dcw* cluster (division and cell wall), a region at minute 2.5 of the *Escherichia coli* chromosome in which a doz-*

forma. Entre estas moléculas se cuentan algunos de los productos de un grupo de genes llamado *dcw* (del inglés *division and cell wall*, división y pared celular). Este conjunto de genes se encuentra en el minuto 2,5 del cromosoma de *Escherichia coli* y consta de una docena de genes responsables de la división celular y de la síntesis de la pared bacteriana. Entre ellos se encuentran los genes *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ* y *ftsI*, este último codifica para una proteína que une penicilina de forma covalente, PBP3, y es esencial para la división celular. Los otros tres codifican proteínas que también son esenciales para la división bacteriana. Hemos encontrado que FtsA contiene un sitio de unión a ATP, de esta forma adquiere validez la predicción de estructura molecular que considera a FtsA como un miembro de una familia de proteínas entre las que se incluye la actina, una proteína de células eucarióticas que participa en la citocinesis. La capacidad de FtsA para unir ATP está asociada a su modificación por fosforilación en el residuo T205. Las dos propiedades de FtsA se correlacionan con su localización intracelular: FtsA aislada de la fracción de la membrana citoplásmica, que en principio es donde debe ejercer su acción durante la división, no puede unir ATP ni está fosforilada.

*en of genes involved in division and cell wall biosynthesis are grouped, they include ftsQ, ftsA, ftsZ and ftsI. This last one codes for a penicillin-binding protein (PBP3) specifically needed for septation. The other three code for proteins which are also essential for division in E. coli. We have found that FtsA contains an ATP-binding site, this validates a predicted molecular structure considering FtsA as a prokaryotic member of a protein family which includes actin, an eukaryotic protein also involved in cytokinesis. The ability of FtsA to bind ATP is accompanied by its chemical modification by phosphorylation in one of its residues (T205). Both properties are also related to the location of the protein inside the cell: FtsA isolated from the cytoplasmic membrane fraction, presumably the place where it should exert its action on division, is not able to bind ATP and is not phosphorylated.*

#### Tesis Doctorales / Doctoral Theses

- Manuel Sánchez. Proteínas FtsQ, FtsA y FtsZ: Tres componentes esenciales del septador de *Escherichia coli*. Universidad Autónoma de Madrid, 1993. Director: M. Vicente.

#### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- Comisión UE Biotechnology, PL920483 y CICYTBIO93-1099-CE. (1993-1995) (coordinador: M. Vicente)
- Comisión UE Human Capital and Mobility Ref. ERBCHRXCT920010. (1993-1995)
- DGICYT, PB89-30 (1991-1993)
- DGICYT, PB93-1232 (1994-1997)
- Comunidad de Madrid, n.º 183/92 (1992-1993)
- Comunidad de Madrid, Acción Especial, n.º 183/92 (1993)
- Comunidad de Madrid, Acción Especial, n.º AE00043/94 (1994)
- Contrato con la empresa HISPANAGAR, SA. (1992-1995)



**Publicaciones / Publications**

- Aldea, M., Garrido, T. and Tormo, A.; Gearbox gene expression and growth rate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 414-420, 1993.
- Garrido, T., Sánchez, M., Palacios, P., Aldea, M. and Vicente, M.: Transcription of *ftsZ* oscillates during the cell cycle of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12, 3957-3965, 1993.
- Pla, J., Palacios, P., Sánchez, M., Garrido, T. and Vicente, M.: Stability of components of the *Escherichia coli* septator. In: Bacterial growth and lysis: Metabolism and structure of the bacterial sacculus. (Eds.) de Pedro, M.A, Hölte, J.-V. and Löffelhardt, W. pp. 363-368, Plenum publishing Co. Ltd. New York, 1993.
- Vicente, M.: INTRODUCTION: A SIMPLE EXPRESSION?: Complexities of genetic regulation in microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 401-402, 1993.
- Garrido, T. and Aldea, M.: Expresión de genes heterólogos en bacterias, pp. 3-24, En M. Vicente (Coord.) "Avances en Ingeniería Genética", CSIC, 1993.
- Ayala, J. A., Garrido, T., de Pedro, M. A. and Vicente, M.: Molecular biology of bacterial septation. In: *Bacterial cell wall*. (Eds.) Hakenbeck, R. and Ghuysen, J.-M. New comprehensive Biochemistry vol. 27, p 73-101. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1994.
- Sánchez, M., Dopazo, A., Pla, J., Robinson, A. C. and Vicente, M.: Characterisation of mutant alleles of the cell division protein FtsA, a regulator and structural component of the *Escherichia coli* septator. *Biochimie* 76, 1071-1074, 1994.
- Sánchez, M., Valencia, A., Ferrándiz, M.-J., Sander, C. and Vicente, M.: Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family. *EMBO J.* 13, 4919-4925, 1994. (and COVER).

**Figura / Figure:**

La estructura de la proteína FtsA se ha deducido por homología con la estructura de actina, y se ha comprobado que puede unir ATP (en blanco en el interior) corroborando la validez de la deducción.

*The structure of FtsA has been predicted from its homology with actin. The ability to bind ATP (depicted in white inside the molecule) has been used to validate the predicted model.*

# Biología Molecular de los Cromosomas Eucarióticos

## Molecular Biology of Eukaryotic Chromosomes

**JORGE BERNARDO**  
**SCHVARTZMAN BLINDER**

Jefe de Grupo  
*Group leader*

**PABLO HERNÁNDEZ VALENZUELA**  
**DORA BEATRIZ KRIMER SMUNIS**  
Investigadores  
*Senior Investigators*

**VIANNEY CASTAÑEDA MONROY**  
**CARLOS LÓPEZ ESTRAÑO**  
**DAVID SANTAMARÍA VELLILA**  
**ENRIQUE VIGUERA MINGUEZ**  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**M.<sup>a</sup> LUISA MARTÍNEZ ROBLES**  
**M.<sup>a</sup> PILAR ROBLES GONZÁLEZ**  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

### Iniciación y terminación de la replicación

El análisis de intermediarios de replicación (IsR) por electroforesis bidimensional en geles de agarosa permite conocer cómo replica un fragmento de DNA: 1) a partir de un origen interno; 2) mediante una horquilla que lo recorre de un extremo al otro; o 3) mediante dos horquillas que se desplazan en sentidos opuestos y se encuentran dentro del fragmento en estudio. El análisis de mezclas de IsR de pBR322 digeridos con distintas enzimas de restricción de corte único nos ha permitido demostrar que la forma de la señal de burbuja (correspondiente a IsR que contienen un origen activo) varía dependiendo de la posición relativa del origen dentro del fragmento. El estudio de IsR del plásmido lanzadera pYRP7' en sistemas de replicación unidireccional (ColE1 en *E. coli*), bidireccional de iniciación específica (ARS1 en *S. cerevisiae*) y bidireccional de iniciación al azar (en oocitos de *X. laevis*) ha hecho posible la caracterización y el estudio comparativo de los distintos patrones generados en cada caso.

### Análisis de la replicación de los genes ribosómicos (rDNA)

Utilizamos el rDNA como modelo para estudiar la replicación del DNA genómico de organismos eucarióticos. Los resultados obtenidos en varias especies han puesto de manifiesto características comunes notables: 1) la iniciación de la replicación ocurre en una fracción de las repeticiones y siempre dentro del espaciador intergénico no transcrito (NTS); 2) en algunas especies la iniciación ocurre preferentemente a partir de una región curvada, rica en pares AT, localizada ups-

### Initiation and termination of DNA replication

*Analysis of replication intermediates (RIs) by two-dimensional agarose gel electrophoresis allows identification of the replication mode of any DNA fragment: 1) from an internal origin, 2) by a single fork traversing the fragment from one end to the other, or 3) by two forks moving in opposite directions that meet somewhere within the fragment. Analysis of mixtures of RIs of pBR322 linearized with different restriction endonucleases allowed us to show that the shape of the bubble-signal (generated by RIs containing an active origin) varies depending on the relative position of the origin within the fragment. Finally, analysis of RIs of the shuttle vector pYRP7' from cells that replicate in a unidirectional manner (ColE1 in *E. coli*), in a bidirectional manner from a specific origin (ARS1 in *S. cerevisiae*) and in a bidirectional manner where initiation occurs at random (oocytes of *X. laevis*), allowed us to characterize and compare the different patterns generated in each of these systems.*

### Analysis of the replication of ribosomal genes (rDNA)

*We use rDNA as a model system to study DNA replication in eukaryotic organisms. The results obtained in several species showed some striking common features: 1) initiation of DNA replication occurs within the non-transcribed spacer (NTS) in only a small fraction of the rDNA repeats; 2) at least in some species, initiation takes place preferentially at a curved, AT-rich locus located upstream the transcription initiation site; 3) forks moving in the direction opposite to transcription*



**Figura / Figure:**  
Electroforesis bidimensional en gel de agarosa.  
*Two dimensional agarose gel electrophoresis.*

*ream* del sitio de iniciación de la transcripción; 3) las horquillas que se mueven en sentido contrario al de la transcripción se detienen en el extremo 3' de la unidad transcripcional. Estos resultados indican que la mayoría de los genes ribosómicos son replicados unidireccionalmente en el mismo sentido de la transcripción. La barrera para la replicación, conservada desde levaduras hasta mamíferos, actúa evitando la colisión frontal de las maquinarias transcripcional y replicativa. Actualmente estamos estudiando los factores *cis* y *trans* requeridos para esta barrera polar.

#### **Identificación y clonaje de genes involucrados en la diferenciación celular**

Utilizamos como modelo la línea celular MEL (*murine erythroleukemia*) derivada de progenitores eritroides cuya diferenciación ha sido bloqueada. Estas células pueden ser inducidas a reiniciar su diferenciación por medio de varios compuestos químicos entre los que destaca el hexametilénbisacetamida (HMBA). Nuestro objetivo principal es la identificación de genes cuya activación (o inactivación) tenga lugar durante los estadios tempranos de la diferenciación o determinación celular. Hemos utilizado métodos de hibridación diferencial y/o substracción para barrer librerías de cDNA construidas a partir de mRNA aislado de células MEL tratadas con HMBA. Se han identificado varios genes que presentan una expresión diferencial entre los que destacamos aquellos que codifican para una proteína-quinasa, una ubiquitina y la histona H3.3. Asimismo, se han aislado genes cuya secuencias no presentan homología con las existentes en el GenBank y/o EMBL y que están siendo analizados con el objeto de comprobar su especificidad en tejidos eritroides y su posible papel en la diferenciación celular.

*are stalled at the 3' end of the transcription unit. All these results led us to conclude that most of the rDNA replicates in a unidirectional manner co-oriented with transcription. The polar fork barrier is strongly conserved from yeast to mammals, and prevent frontal collision between replicational and transcriptional machineries. We are currently studying the cis- and trans-acting factors required for this barrier.*

#### **Identificación y clonaje de genes involucrados en la diferenciación celular**

*We use MEL (murine erythroleukemia) cells as a model system to identify genes involved in cell differentiation. MEL cells derive from erythroid precursors that have their differentiation pathway blocked. They can be induced to re-initiate differentiation by a number of treatments including hexamethylenbisacetamida (HMBA). Our main goal is to identify genes that are activated or de-activated during the early steps of differentiation. We have used subtraction hybridization with complex cDNA probes synthesized with mRNAs isolated from undifferentiated and cells committed to differentiate, to screen a cDNA library made with polyA+ mRNA from MEL cells that were induced to differentiate with HMBA. We identified several genes showing a differential pattern of expression during differentiation. Among them those coding for a protein kinase, an ubiquitin and histone H3.3. We also cloned several genes showing no homology with those registered at GeneBank or EMBL. We are currently testing whether some of these genes are erythroid specific and their possible role in cell differentiation.*

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CAM, 00159/92 (1992-1993)
- FIS, 93/0161 (1993-1995)
- CAM, AE00118/94 (1994-1995)
- DGICYT, HF94-201 (1994-1995)
- Convenio CSIC-Universidad de Tel-Aviv (1994-1995)

**Publicaciones / Publications**

- Hernández, P., Martín-Parras, L., Martínez-Robles, M.L. and Schwartzman J.B.: Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes. *EMBO J* 12, 1475-1485, 1993.
- Krimer, D.B., Cheng G. and Skoultchi, A.I.: Induction of H3.3 replacement histone mRNAs during the precommitment period of murine erythroleukemia cell differentiation. *Nucl. Acid Res.* 21, 2873-2879, 1993.
- Schwartzman, J.B., Martínez-Robles, M.L. and Hernández, P.: The migration behaviour of DNA replicative intermediates containing an internal bubble analyzed by 2-Dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucl. Acid Res.* 21, 5474-5479, 1993.

# Reproducción Celular

## Cell Proliferation

**JOSÉ LUIS CÁNOVAS PALACIO-VALDÉS**

Jefe de Grupo

*Group leader*

**CONSUELO DE LA TORRE**

**GARCÍA-QUINTANA**

**M.<sup>a</sup> AURORA GONZÁLEZ FERNÁNDEZ**

Investigadores

*Senior Investigators*

**GONZALO GIMÉNEZ MARTÍN**

Investigador Asociado

*Associate Scientist*

**M.<sup>a</sup> INMACULADA GIMÉNEZ ABIÁN**

B. Postdoctoral

*Postdoctoral fellow*

**LETICIA BORBOA DE CUETOS**

B. Predoctoral

*Graduate student*

**MARGARITA CARRASCOSA CEBRIÁN**

**JOSÉ LUIS MARCILLA CABANILLAS**

Personal Técnico

*Technical Staff*

### 1. Optimización de un ensayo de genotoxicidad en meristemos de plantas

El desarrollo y la homologación de ensayos sencillos y fiables para la detección de carcinógenos es una necesidad que llevó a la Agencia de Protección Medioambiental norteamericana a coordinar un Proyecto mundial —el Programa *GeneTox*— para valorar la potencialidad del material vegetal como biomarcador de genotoxicidad (Grant W.F. Mutation Res. 99,273-291, 1982). El informe previo sobre este esfuerzo era poco esperanzador, por la variabilidad observada en las respuestas obtenidas, en una misma especie y en distintos laboratorios, ante un mismo mutágeno (Sandhu et al. Mutation Res. 257, 19 - 25, 1991).

En este contexto, este grupo ha desarrollado un ensayo de genotoxicidad que cumple los requisitos exigibles en meristemos de la raíz de *Allium cepa* L. Presenta las siguientes características: 1) sólo requiere una incubadora con control de temperatura y mecanismo de aireación, 2) fija la concentración de la sustancia problema en aquella que apenas deprime la tasa de elongación de las raíces, ya que ello indica que el flujo por las etapas del ciclo celular no está bloqueado y asegura, secundariamente, la llegada de las células a mitosis, etapa que se usa como ventana de observación, 3) se basa en el recuento de ana-telofases al microscopio óptico, para detectar la frecuencia de ellas en las que aparecen cromosomas dañados, 4) revela el posible daño genotóxico inducido mediante la cancelación de las actividades de chequeo relacionadas con la reparación en G2 por empleo de un análogo de las pu-

### 1. Optimized protocol for genotoxicity assessment in plant meristems

*The need for simple and reliable assays for genotoxicity led the US Environmental Protection Agency to coordinate the GeneTox Programme to encourage the use of plant material (Grant, Mutation Res. 99, 273 - 291, 1982). Variability in the previous results obtained when applying a similar mutagenic agent to plant cells in different laboratories made this effort discouraging (Sandhu et al., Mutation Res. 257, 19 - 25, 1991).*

*In this context, this group has developed a genotoxicity assay in Allium cepa L. which fulfils the desired requirements. Hence, the protocol has the following features: 1) it only requires a growth incubator and an airtation system, 2) the correct concentration of the chemical to be tested is fixed as that which hardly depresses the elongation rate of the roots. In this way cell flow throughout the cycle phases and, secondarily, the entrance of the cells into the mitotic observation window are ensured, 3) it consists in recording of the frequency of ana-telophases displaying broken chromosomes in the treated roots from half a bulb, in comparison with the frequency obtained in their isogenic control formed by those roots from the other untreated half bulb 4) analogues of the DNA canonical purines are used in order to develop the possible genotoxic damage induced by such mild concentration. In this way, the checking out of DNA damage and/or the subsequent G2 repair are cancelled, and the cells enter precociously into mitosis with unrepaired lesions (Andreassen and Margolis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2272-*

rinas del DNA (Andreassen y Margolis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89,2272-2276,1992) y 5) los resultados obtenidos son reproducibles.

## 2. Regulación de la proliferación celular

**2.1.** Se ha determinado cómo la nucleogénesis en el núcleo post-mitótico, un proceso que depende de la reiniciación de la transcripción en el NOR de replicación tardía, se encuentra bajo un control negativo en el que están implicadas secuencias de replicación temprana. La metodología implica la fotosensibilización selectiva de partes del genoma por incorporación restringida a una parte del periodo S de análogos de las pirimidinas canónicas del DNA.

**2.2.** Se ha establecido la existencia de patrones distintos de proteínas ante dos estrés térmicos distintos (frío y calor) en los meristemas de raíces de *Allium*.

**2.3.** Se ha discriminado el acople entre los ciclos microtubular (fig.) y mitótico en meristemas creciendo en condiciones de equilibrio dinámico, lo que ha llevado a establecer que la banda preprofásica de microtúbulos, que caracteriza a la célula vegetal y es responsable de la morfogénesis de cada tejido, aparece muy al final de G2, casi al comienzo de la propia profase y no en la transición de S a G2, como se aceptaba.

2276,1992), and 5) the results obtained are reproducible.

## 2. Regulation of cell proliferation

**2.1.** It has been unveiled that nucleogenesis in the post-mitotic nucleus, a process which depends on the reinitiation of transcription in the late-replicating NOR, is under a negative control involving early replicating DNA sequences. The method implies photosensitization of restricted segments of the genome by incorporation of analogues of DNA canonical pyrimidines during short periods of the S phase.

**2.2.** The strictly differential patterns of polypeptides produced in the *Allium* meristems under two situations of thermal stress (cold and heat) were compared.

**2.3.** The coupling of the microtubular and mitotic cycles in these plant cells when proliferating under steady state kinetics has unequivocally shown that the appearance of the preprophase band of microtubules, which was accepted to appear in the S to early G2 transition and is responsible of the morphogenetic pattern of a specific tissue, was strictly timed to the beginning of chromosome condensation which characterizes the start of prophase.

## Científicos Invitados / Visiting Scientists

- Dra. J. Pincheira, Universidad de Chile (IX y X-1993).
- Dra. M.J. González, Universidad de Chile (IX y X-1993).
- Dr. Nikolay Sjakste, Institute of Organic Synthesis, Riga, Letonia (XI a XII-1993).
- Dra. Tatjana Sjakste, Institute of Biology, Salaspils, Letonia (XI a XII-1993).
- Prof. J. Sans, Universidad de Chile (IX a X-1994).
- Dr. N. Galanti, Universidad de Chile (X-1994).
- Dr. R. Fernández-Donoso, Universidad de Chile (X a XI-1994).
- Prof. C. Leyton, Universidad de Chile (XI-1994).

**Organismos financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, SAL91-0697 (1992-1994)
- Fundación Ramón Areces (1991-1993)
- Convenio CSIC-Universidad de Chile (1993-1994)

**Publicaciones / Publications**

- González-Fernández, A., Navarrete, M.H. and de la Torre, C.: Role for early replicating DNA in preventing precocious nucleologenesis in plant proliferating cells. *Protoplasma* 175 , 138-143,1993.
- Utrilla, L., Giménez-Abián, M.I. and de la Torre, C.: Timing the phases of the microtubule cycles involved in cytoplasmic and nuclear divisions in cells of undisturbed onion root meristems. *Biol. Cell* 78, 235 - 241,1993.
- Moreno, M.L., Ferrero, M.L. and de la Torre, C.: The pattern of polypeptides in proliferating cells of *Allium cepa* L. during cold and heat conditions. *J. Plant Physiol.* 143, 759 -762 ,1994.
- Moreno, M.L. Ferrero, M.L., Utrilla, L. and de la Torre, C.: Cellular changes during cold adaptation in tolerant *Allium cepa* meristems. *Cytobios* 78, 69 -79 1994.

# Proliferación y Diferenciación de Células Mieloides

## *Proliferation and Differentiation of Myeloid Cells*

---

**PATRICIO ALLER TRESGUERRES**

Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**FRANCISCO PELAYO CORTINES**

**CONCEPCIÓN PÉREZ MARTÍN**  
Investigadores Asociados  
*Associated Scientists*

**NURIA E. VILABOA DÍAZ**

**LAURA GARCÍA BERMEJO**  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**ELENA DE BLAS BROTONS**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

---

Nuestro grupo desarrolla un programa de investigación sobre proliferación, diferenciación y apoptosis de células mieloides. Como sistema biológico se utilizan líneas celulares leucémicas humanas, tales como: células promonocíticas U-937, células promielocíticas HL-60, y células eritroblastoides K562.

El proyecto principal consiste en la caracterización de los mecanismos por los que concentraciones subcitotóxicas de agentes antitumorales con actividad anti-DNA topoisomerasa son capaces de inducir la activación y diferenciación celular. Se utilizan inhibidores de DNA topoisomerasa II con distintos mecanismos de acción, a saber, agentes que estabilizan los complejos DNA-topoisomerasa en forma covalente y causan roturas en el DNA (tales como el etopósido, el amsacrino, la adriamicina y la mitoxantrona), así como nuevos agentes de acción no clastogénica (como el ICRF-193). El proyecto incluye: (1) El análisis de la expresión de los genes de inducción temprana *c-fos*, *c-jun*, *jun B* y otros proto-oncogenes, así como de la expresión de genes implicados en el establecimiento del fenotipo diferenciado, tales como los codificantes de filamentos intermedios. (2) La caracterización de las secuencias de DNA que regulan la inducción génica por agentes anti-topoisomerasa, para lo cual se utilizan diversas construcciones del promotor del gen *CD11c*. De igual modo, el análisis de la actividad de los factores de transcripción *AP-1* y *NF-kB*. (3) El estudio de señales intracelulares tales como la actividad proteína quinasa C. (4) El análisis de la expresión y secreción de los moduladores de la res-

*We are currently working on the proliferation, differentiation and apoptosis of myeloid cells. As a biological system we use human leukemia cell lines such as: U-937 promonocytic cells, HL-60 promyelocytic cells, and K562 erythroblastoid cells.*

*The main project consists in the characterization of the mechanisms by which subcytotoxic concentrations of anti-tumor, anti-DNA topoisomerase agents cause cell activation and differentiation. For this purpose we use DNA topoisomerase II inhibitors with different action mechanisms, namely agents which as etoposide, amsacrine, adriamycin and mitoxantrone cause DNA-topoisomerase covalent complex stabilization and DNA breakage, as well as non-clastogenic agents such as ICRF-193. The project includes: (1) The analysis of the expression of the early response genes *c-fos*, *c-jun*, *junB* and other proto-oncogenes, as well as the expression of genes involved in the establishment of the differentiated phenotype, such as intermediate filament protein genes. (2) The characterization of DNA sequences involved in the activation of gene expression by anti-topoisomerase agents, using different constructions of the *CD11c* gene promoter. In addition, the analysis of the activity of the *AP-1* and *NF-kB* transcription factors. (3) The analysis of intracellular signals such as protein kinase C activity (4) The study of the expression and secretion of the biological response modifiers *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* and the expression of their receptors, since it could represent an autocrine mechanism for cell activation. In addition, the study of the possible cooperation of these cytokines and some*



puesta biológica TNF- $\alpha$  e IL-6 y de la expresión de sus receptores, lo que podría constituir un mecanismo autocrino de activación celular. Asimismo, el análisis de la posible cooperación entre dichas citoquinas y algunos CSFs con los agentes anti-topoisomerasa para inducir la activación y diferenciación celular. (5) El estudio de la relación entre diferenciación y apoptosis, que también es inducida por agentes anti-topoisomerasa. Asimismo, el estudio de la posible relación entre diferenciación y estrés celular, analizando la expresión de los genes *heat-shock* HSP70 y HSP27, así como la expresión del gen MDR1, que es también un gen de estrés y responsable principal de la «resistencia múltiple a drogas».

Se espera de este modo mejorar el conocimiento de los mecanismos de acción de los inhibidores de DNA topoisomerasas, de gran interés en terapia antitumoral, así como aportar información sobre sus posibles aplicaciones en terapias de diferenciación.

*CSFs with the anti-topoisomerase agents to induce cell activation and differentiation. (5) The study of the possible relationship between differentiation and apoptosis, which is also caused by topoisomerase inhibitors. In addition, the study of the possible relationship between differentiation and stress, by analyzing the expression of the HSP70 and HSP27 heat-shock genes as well as that of the MDR1 gene, a stress gene which is also the main determinant of the multidrug resistance phenotype.*

*The project could allow to obtain new information on the action mechanisms of antineoplastic DNA topoisomerase inhibitors as well as on their possible use in differentiation therapies.*

#### **Tesinas de Licenciatura y Tesis Doctorales / *Master and Doctoral Thesis***

- María Laura García Bermejo. Efectos del butirato de sodio en células mieloides humanas: proliferación y expresión de proto-oncógenes. Universidad de Alcalá de Henares, 1993. Tesina. Director: P. Aller Tresguerres.
- María Almudena Leal Carrasco. Regulación por dexametasona y 1,25-dihidroxivitamina D3 del receptor de insulina y del gen que lo codifica en la línea celular U-937. Universidad Autónoma de Madrid, 1994. Tesis. Directores: C. Calle García y P. Aller Tresguerres.

#### **Organismos Financiadores / *Funding Agencies***

- DGYCIT, PB910062 (1992-1995)
- FISS, 94/0008-01 (1994-1996)

**Publicaciones / Publications**

- Leal, M.A., Aller, P., Torres, A., Picardo, A. and Calle, C.: Tissue-specific modulation of insulin receptor mRNA levels in a patient with a pheochromocytoma. *Clin. Endocrinol.* 39, 619-621, 1993.
- Rius, C., Vilaboa, N.E., Mata, F. and Aller, P. : Differential modulation of the expression of the intermediate filament proteins vimentin and nuclear lamins A and C by differentiation inducers in human myeloid leukemia (U-937, HL-60) cells. *Exp. Cell Res.* 208, 115-120, 1993.
- Leal, M.A., Aller, P., Torres, A., Picardo, A., Dávila, N. and Calle, C.: Insulin receptor mRNA levels are modulated in a tissue-specific manner in Cushing's syndrome patients. *Horm. Metab. Res.* 26, 349-350, 1994.
- Pérez, C., Campayo, L., Navarro, P., García-Bermejo, L. and Aller, P.: The action of the DNA intercalating agents 4'-(9-acridinylamino)methanesulphon-m-anisidide and 1,4-bis(butylamino)benzo[g]phthalazine in U-937 human promonocytic cells: relationship between cell cycle and differentiation. *Biochem. Pharmacol.* 48, 75-82, 1994.
- Pérez, C., Pelayo, F., Vilaboa, N.E. and Aller, P.: Caffeine attenuates the action of amsacrine and etoposide in U-937 cells by mechanisms which involve inhibition of RNA synthesis. *Int. J. Cancer* 57, 889-893, 1994.
- Pérez, C., Vilaboa, N.E. and Aller, P.: Etoposide-induced differentiation of U937 promonocytic cells: AP-1-dependent gene expression and protein kinase C activation. *Cell Growth Differ.* 5, 949-955, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Leal, M.A., Aller, P., Mas, A. and Calle, C.: The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on insulin binding, insulin receptor mRNA levels and isotype RNA pattern in U-937 human promonocytic cells. *Exp. Cell Res.* (in press, 1995).

# Regulación de la Expresión de Genes Eucariotas

## Laboratory of Eukaryotic Gene Expression

---

**MIGUEL ÁNGEL VIDAL CABALLERO**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**JON SCHOORLEMMER** (Desde X-1993)

B. Postdoctoral

*Postdoctoral Fellow*

**ROSA DE LA COLINA MONTERO**

**FELIPE WERE EDUARDO**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

---

### Regulación de la expresión de genes de queratinas

La familia de genes de queratinas constituye un sistema modelo de estudio de expresión de genes eucariotas. Las queratinas son un componente principal del citoesqueleto de células epiteliales de vertebrados. La expresión de genes de queratinas es específica de tejido y desarrollo. Las queratinas están codificadas por dos grupos de genes correspondientes a queratinas de tipo I y tipo II. Nosotros nos hemos concentrado en los genes de queratinas de tipo II, K8 y K5. La queratina 8 es específica de epitelios simples (mesotelio, epitelios glandulares, etc) mientras que la queratina 5 se encuentra en la capa basal de todos los epitelios estratificados (epidermis, epitelios digestivos, etc.).

Para estudiar los elementos reguladores en cis de la expresión de los genes K8 y K5 hemos generado ratones transgénicos portadores de diversas construcciones génicas. Hemos mostrado que un fragmento de 12 kb del locus de la queratina 8 humana, conteniendo el gen junto con 1.1 kb y 3.2 kb de secuencias flanqueantes 5' y 3' respectivamente, contiene suficientes elementos de control para su correcta expresión en tejidos adultos de ratones transgénicos. Además, se expresa de modo independiente de sitio de integración y dependiente de número de copia. Esta es una propiedad inusual entre transgenes, y sugiere que este fragmento del locus de la queratina 8 contiene una región controladora de locus. Resultados preliminares muestran que elementos de control importantes para la expresión de la queratina 8 se encuentran en secuencias intergénicas. Por el

### Regulation of keratin gene expression

*Keratin genes are an useful model for the study of eukaryotic gene expression. Keratin intermediate filaments are a major constituent of vertebrate epithelial cells. Keratins are expressed in a tissue-specific and developmentally controlled manner. They are encoded by two gene families corresponding to type I and type II keratins. We have concentrated our studies on the type II keratins K8 and K5. Keratin 8 is found in simple epithelial cells, such as those of mesothelium and glandular epithelia, whereas K5 is found in the basal layer of all stratified epithelia (epidermis, stratified digestive epithelia, etc.) To study the cis-acting elements that control the tissue-specific and developmental expression of keratins 8 and 5 we have generated transgenic mice carrying a number of K8 and K5 constructs. We have shown that a 12 kb DNA fragment of the human K8 locus, including the gene flanked by 1.1 kb of 5' and 3.2 kb of 3' sequences, contains sufficient control elements for appropriate expression in most adult tissues of transgenic mice. In addition, this transgene showed integration-independent and copy-dependent expression. These two rather unusual characteristics of gene expression suggest that this genomic fragment may contain a locus control region. Preliminary results to map cis-acting elements indicated that intragenic sequences contain important regulatory regions. In contrast, our studies on the K5 gene have shown that 5.3 kb of 5' flanking sequences of the bovine gene (but not promoter proximal sequences) are sufficient to confer appropriate tissue-specific and deve-*

contrario, nuestros resultados con el gen de la queratina 5 muestran que 5.3 kb de secuencias flanqueantes 5' (pero no regiones proximales al promotor) confieren expresión específica de tejido y desarrollo a un gen *lacZ* de *Escherichia coli* en ratones transgénicos.

Sorprendentemente, los transgenes K5-*lacZ* son inactivados durante el desarrollo y los animales adultos muestran un patrón de expresión mosaico, reminiscente del silenciamiento génico observado en los efectos de posición variegante en *Drosophila*. Es posible que estos ratones sean útiles en el análisis funcional de genes murinos homólogos de genes de *Drosophila* implicados en el mantenimiento del estado transcripcional reprimido. Finalmente, hemos iniciado un proyecto para clonar nuevos miembros de este tipo de genes represores en ratón, mediante la utilización de un sistema genético en levaduras capaz de detectar interacciones proteína-proteína *in vivo*.

#### **Obtención de ratones con mutaciones en el gen de la queratina 5 a través de recombinación homóloga en células ES**

Mutaciones en el gen de la queratina K5 (y en los de otras queratinas) están directamente relacionadas con enfermedades de la piel en humanos tales como epidermolisis bullosa. Nosotros estamos tratando de generar un modelo animal de la enfermedad mediante la inactivación del gen de la queratina 5 en ratón. Hemos obtenido clones de células ES en los que un alelo del gen de la queratina 5 ha sido modificado por recombinación homóloga para dar lugar a una mutación nula. En la actualidad estamos tratando de generar ratones quiméricos en línea germinal portadores de esta mutación.

*developmental expression to the lacZ gene of Escherichia coli in transgenic mice. Surprisingly, the K5-lacZ transgenes are inactivated during development in such a way that adult mice show mosaic expression patterns, reminiscent of those position effect variegation phenomena observed in Drosophila. Therefore, these mice may prove to be useful in the functional analysis of murine genes homologous to those of Drosophila involved in the maintenance of the transcriptionally repressed state. Lastly, we have started a project to clone new members of this type of repressor genes in the mouse, by using a yeast two-hybrid system that detects protein-protein interaction in vivo.*

#### **Generation of mice deficient in keratin 5 by gene targeting in ES cells.**

*Mutations in the K5 gene (and in other keratin genes) are directly associated to skin diseases in humans, such as epidermolysis bullosa. We are trying to develop an animal model of the disease, by targeting the K5 gene in the mouse. We have already obtained clones of ES cells with one allele of the K5 altered by homologous recombination. Currently we are generating germ line chimeric mice that carry the mutation.*

**Tesis Doctorales / Doctoral Thesis**

- Ángel Ramírez Merino. Elementos reguladores en cis de la expresión génica de las queratinas 5 y 6; análisis en ratones transgénicos. Universidad Complutense de Madrid, 1993. Director M.A. Vidal.

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- Fundación Ramón Areces (1991-1993)
- CICYT PB91-0111 (1992-1994)

**Patentes / Patents**

- Ramírez, A., Vidal, M.A., Bravo, A. and Jorcano, J.L.: Transgenic animals for the determination of agents which stimulate or repress epidermal hyperproliferation and hair growth. Solicitud de patente en la Unión Europea por el CIEMAT (archivada el 24.03.94) Solicitud n.º 94500055.2.

**Publicaciones / Publications**

- Yazdanbakhsh, K., Fraser, P., Kioussis, D., Vidal, M., Grosveld, F. and Lindenbaum, M.: Functional analysis of the human neurofilament light chain gene promoter. *Nucl. Acid Res.* 21, 455-461, 1993.
- Ramírez, A., Bravo, A., Jorcano, J. and Vidal, M.: Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue and cell type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation* 58, 53-64, 1994.
- Vidal, M.: Ratones transgénicos. In: *Avances en Ingeniería Genética* (ed.), M. Vicente CSIC. Madrid. pp. 381-402, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Papers**

- Casanova, L., Bravo, A., Were, F., Ramírez, A., Jorcano, J. and Vidal, M.: Tissue-specific and efficient expression of the human simple epithelial keratin 8 gene in transgenic mice. *J. Cell Sci.* (in press, 1995).

# Control Transcripcional en Eucariotas

## *Control of Transcription in Eukaryots*

---

**JAVIER REY CAMPOS**

(Desde VI-1994)

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**CRISTINA PÉREZ SÁNCHEZ**

(Desde IX-1994)

**ANDRÉS ESTEBAN GAMBOA**

(Desde IX-1994)

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**BEGOÑA TORRES BELINCHÓN**

(Desde XI-1994)

**M.<sup>a</sup> DEL CARMEN ARIAS**

DE LA FUENTE (Desde XI-1994)

Pregraduados

*Undergraduate Students*

---

Este laboratorio se creó en Junio de 1994 con la incorporación del Dr. Rey Campos como personal científico del CIB. Los restantes miembros del equipo se han ido incorporando sucesivamente hasta la presente configuración correspondiente a Diciembre de 1994.

Nuestro objetivo principal es el estudio de los mecanismos moleculares de control de la transcripción en eucariotas superiores. Nuestro trabajo se centra actualmente en la caracterización de los mecanismos de control transcripcional en el hígado de los mamíferos. Durante varios años, diversos grupos a nivel internacional, hemos caracterizado las regiones implicadas en el control de la transcripción de muchos genes hepáticos tratando de determinar factores comunes que puedan dar cuenta de la expresión diferencial de estos genes. De esta manera se han caracterizado varios factores de transcripción (HNF1, vHNF1, HNF3 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , HNF4, C/EBP, NF-IL6, DBP, LAP etc.) con relevancia para la expresión hepática de muchos genes. Así, hemos comprobado que la transcripción del gen humano *C4BPA*, que codifica la cadena  $\alpha$  de la proteína reguladora de actividad del complemento C4b-Binding Protein y que ha sido uno de los genes hepáticos modelo que hemos utilizado, está regulada por los factores de transcripción hepáticos HNF1 y HNF3 así como por otros factores aun no identificados. Este trabajo fue llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Rodríguez de Córdoba del CIB. Actualmente estamos interesados en determinar el mecanismo por el cual los factores de transcripción son capaces de activar la transcripción. Para ello utilizamos el gen *C4BPA* como modelo, ya que

*Our laboratory was created in June 1994 when Dr. Rey-Campos became a tenured scientist at the CIB. The other members have subsequently joined the group to reach the above configuration corresponding to December 1994.*

*Our main concern is the study of the molecular mechanisms of control of transcription in higher eukaryots. Currently, our work focus on the characterisation of the mechanisms of transcriptional control in the liver of mammals. Along several years, many groups in the world have characterised genomic regions important for the control of transcription of many liver-specific genes. The goal was finding common factors which could account for the differential expression of these genes. As a result, several transcription factors (HNF1, vHNF1, HNF3 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , HNF4, C/EBP, NF-IL6, DBP, LAP, etc.) relevant for the hepatic-specific expression of many genes have been characterised. Thus, we have found that HNF1 and HNF3, together with other, as yet, unidentified factors, control the transcription of the human gene *C4BPA*, which encodes the  $\alpha$  chain of the complement regulatory protein C4b-Binding Protein. We have used this gene as one of our models of hepatic-specific genes in collaboration with the group of Dr. Rodríguez de Córdoba at the CIB. We are now interested in determining how transcription factors actually activate transcription. Since our results indicate that the transcription of the *C4BPA* gene is absolutely dependent on binding of the liver-enriched transcription factors HNF1 or vHNF1 to the promoter, we are using this model to study the molecular bases of the activation of*

nuestros resultados indican que la transcripción de este gen requiere, de una manera absoluta, la unión del factor de transcripción hepático HNF1 (o vHNF1) a su promotor. Por un lado, estamos llevando a cabo la caracterización de las regiones de las moléculas de HNF1 y vHNF1, implicadas en el proceso de activación de la transcripción. Hemos encontrado, en colaboración con el grupo del Dr. Moshe Yaniv, del Instituto Pasteur de París, que el RNA del factor de transcripción vHNF1 sufre procesos de *splicing* alternativo que afectan a su capacidad de activación de la transcripción. Por otro lado, queremos conocer que factores generales de transcripción están implicados en proceso de activación de la transcripción por HNF1 y vHNF1. Además también estamos interesados en conocer como dos o más factores de transcripción que reconocen sitios próximos dentro de una misma región reguladora, pueden interaccionar estructural o funcionalmente de una manera relevante al proceso de transcripción genética.

Otro de nuestros objetivos es conocer como se controla la expresión de los factores de transcripción hepáticos. En este sentido estamos llevando a cabo el clonaje y caracterización de las regiones reguladoras (promotores y enhancers) de dos de los factores de transcripción hepáticos más importantes, HNF4 y HNF3, ambos implicados en el control de la expresión del gen de HNF1. Ya que los procesos de diferenciación celular se caracterizan por el establecimiento de patrones de expresión genética específicos del estado diferenciado, pensamos que el conocer como se regula la expresión de los factores de transcripción específicos del hígado puede ayudarnos a entender los mecanismos implicados en los procesos de diferenciación hepática.

*transcription by these two factors. First, we are addressing the characterisation of the regions of the HNF1 and vHNF1 molecules responsible for the transactivation process. In this regard, we have found, in a collaborative effort with Dr. Moshe Yaniv at the Institut Pasteur (Paris), that the transactivation capacity of vHNF1 is regulated by alternative splicing mechanisms. On the other hand, we want to know which general transcription factors are involved in the transcription activation process by HNF1 and vHNF1. In addition, we are also addressing the study of the structural and functional interactions between two or more transcription factors bound to the same regulatory region and the relevance of these interactions to the gene transcription process.*

*Another aim of our group is to know how the expression of the hepatic-specific transcription factors themselves are regulated. To this end, we are currently cloning and characterising the transcription regulatory regions (promoters and enhancers) of two of the most important hepatic-specific transcription factors, HNF4 and HNF3, both involved in the control of the expression of the HNF1 gene. Since the results of the cell differentiation processes are the establishment of patterns of gene expression specific for the differentiated phenotype, we believe that to understand how the expression and the function of liver-specific transcription factors are regulated may help to unravel the mechanisms underlying the hepatocyte differentiation.'*

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PB93-0312 (1994-1997)
- CAM (Acción Especial), AE00055/94 (1994)
- CSIC (Acción Especial), (1994)

**Publicaciones / Publications**

- Ringeisen, F., Rey-Campos, J., Bach, I. and Yaniv, M.: The transactivation potential of vHNF1 is modified by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 268, 25706-25711, 1993.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Arenzana, N., Rodríguez de Córdoba, S. and Rey-Campos, J.: The hepatic activity of the promoter of the gene coding for the  $\alpha$ -chain of C4b-binding protein (*C4BPA*) requires HNF1. *Biochem. J.* (in press, 1995).



# Biología Celular y del Desarrollo de Nematodos

## *Cellular and Developmental Biology of Nematodes*

**CLARA GODAY BAYLINA**

Jefe de Grupo - Investigadora  
*Group leader - Senior Investigator*

**ROSARIO ESTEBAN FERNÁNDEZ**

**GIOVANNA GIOVINAZZO**

**YANINA PANZERA** (Desde XI-1994)

B. Predoctorales  
*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, para identificar proteínas cromosómicas y proteínas relacionadas con el huso implicadas en la organización y/o segregación de los cromosomas. Usando extractos proteicos de embriones de *Parascaris* univalens como inmunógenos hemos producido una serie de anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes antígenos de interés (colaboración con el Dr. A. de la Hera, CIB). Nos hemos centrado en analizar los antígenos que en células de *Parascaris* se asocian a: 1) regiones cromosómicas heterocromáticas 2) regiones cromosómicas centroméricas 3) polos del huso mitótico y 4) estructuras ecuatoriales en anillo implicadas en la citocinesis. Hemos estudiado desde el punto de vista citológico y bioquímico la presencia y distribución de cada uno de los antígenos durante el ciclo celular en diferentes tipos celulares de *Parascaris*. En concreto en células que difieren en cuanto al contenido de heterocromatina y la organización del centrómero. Usando dichos anticuerpos hemos investigado, además, la conservación y la distribución celular de los antígenos en distintos organismos, tales como, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y mamíferos. Los anticuerpos seleccionados se están usando para identificar y caracterizar molecularmente los genes codificantes usando librerías de expresión de cDNA de *Parascaris* y *Drosophila*.

Hemos profundizado en el significado biológico del proceso de eliminación

*We are using the nematode Parascaris as a model to study structural and functional aspects of eucariotic chromosomes. In particular, to identify chromosomal and spindle-related proteins involved in chromosome organization and/or segregation. Using protein extracts from Parascaris embryos as immunogens, we have produced a series of monoclonal antibodies that recognize different antigens of interest (collaboration with Dr. A. de la Hera, CIB). We have focused on the Parascaris antigens that associate to: 1) heterochromatic chromosomal regions 2) centromeric chromosomal regions 3) spindle poles and 4) ring-like equatorial structures implicated in cytokinesis. Using immunofluorescence and immunoblotting, we have studied the presence and distribution of each antigen during cell cycle in different Parascaris cell types where chromosomes differ greatly with respect to heterochromatin content and centromere organization. We have also investigated the conservation and cell distribution of the antigens in distant organisms like yeast, C. elegans, Drosophila, and mammalian cells. The selected antibodies are now being used to screen Parascaris and Drosophila cDNA expression libraries to carry out the molecular characterization of the encoding genes.*

*We have further investigated the biological significance of the process of heterochromatin elimination in relation to the separation of somatic-line and germline during early development in Ascaris nematodes. Treating Parascaris embryos with 'vegetalizing', 'animalizing' substances and cytochalasin B we have been able to alter the early blastomere division*

de heterocromatina en relación a la separación de la línea somática y germinal durante el desarrollo temprano de nematodos Ascáridos. Tratando embriones de *Parascaris* con agentes «vegetalizantes» y «animalizantes» y citocalasina B se ha logrado alterar el patrón de división temprana de los blastómeros así como la ocurrencia de la disminución de cromatina. Hemos demostrado que la disminución de cromatina está estrictamente relacionada con el comportamiento de las células somáticas y que la distribución de los factores citoplásmicos implicados en la eliminación de la heterocromatina dependen de los microfilamentos.

*pattern as well as the occurrence of chromatin diminution. We have demonstrated that chromatin diminution is strictly related to somatic cell behavior and that the distribution of the cytoplasmic factors involved in heterochromatin elimination is microfilament-mediated.*

#### Científicos Invitados / Visiting Scientists

- Prof. A.L.P. Perondini. Departamento de Biología. Instituto de Biociencias, Universidad de Sao. Paulo, Brasil. (V a VII-1993).

#### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- DGICYT, PB 90-0073 (1991-1994)
- DGICYT, PB93-0164 (1994-1997)
- Convenio de Cooperación España e Italia, CSIC/CNR. (1993-1994)

#### Publicaciones / Publications

- Goday, C. and Pimpinelli, S.: The occurrence, role and evolution of chromatin diminution in nematodes. *Parasitology Today* 9, 319-322, 1993.
- Jiménez, M. and Goday, C.: A centrosome-associated antibody from *Drosophila melanogaster* reveals a new microtubule-dependent structure in the equatorial zone of *Parascaris univalens* embryos. *J. Cell Sci.* 106, 719-730, 1993.

#### Próximos Artículos / Forthcoming Articles

- Esteban, M. R., Giovinazzo, G. and Goday, C.: Chromatin diminution is strictly correlated to somatic cell behavior in early development of the nematode *Parascaris univalens*. *J. Cell Sci.* (in press, 1995).

# Citogenética Molecular de Dípteros

## Molecular Cyto genetics of Diptera

**JOSÉ LUIS DÍEZ CORTÉS**

(Desde X-1993)

Jefe de Grupo

*Group leader*

**LUISA M.ª BOTELLA CUBELLS**

Investigadores

*Senior Investigators*

**GLORIA MORCILLO ORTEGA**

Investigadora Asociada

*Associate Scientist*

**EDUARDO GORAB**

**MARTA MORENO GONZÁLEZ**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**NIEVES GARCÍA TEJEDOR (1993)**

**JOSÉ LUIS MARTÍNEZ**

(Desde XII-1994)

Pregraduados

*Undergraduate Students*

**JOSEFA FDEZ-CABRERA BAZÁN**

**AMELIA PARTEARROYO LACABA**

Personal Técnico

*Technical Staff*

### Estudio de la regulación de la expresión génica inducida por cambios ambientales en *Chironomus* y *Drosophila*

Los cromosomas politénicos de estos dípteros permiten una observación microscópica directa de la activación/represión de loci génicos como respuesta a cambios medioambientales por lo que se toma como sistema citogenético modelo para el estudio de tales cambios a niveles citológico y molecular.

1. Cambios producidos por choque térmico, que además de la inducción de los loci *heat-shock* propios de *Chironomus* inducen cambios a nivel de los telómeros, con la inducción del llamado TBRIII (Telomeric Balbiani ring, en el brazo R del 3<sup>er</sup> cromosoma Morcillo et al., 1988. *Chromosoma* 96, 139-144). Se ha avanzado en el estudio de la inducibilidad de este *puff* telomérico en otros tejidos (Morcillo et al., 1994. *Exp. Cell Res.* 211, 163-167) y en su naturaleza como auténtico locus de *heat-shock*, inducible por el HSF (*heat shock transcription factor*) como se ve en estudios de inmunocitoquímica con un anticuerpo policlonal de *Drosophila* anti HSF.

Además haciendo uso de Anticuerpos de *Drosophila* se ha demostrado la presencia de la proteína de choque *hsp 83* en el locus 93 D cromosómico de *heat-shock* de *Drosophila* (Morcillo et al., 1993. *Chromosoma* 102, 648-659). Este locus podría estar relacionado con el locus telomérico inducible por choque en *Chironomus*, TBRIII, con el interés de que 93\_D en *Drosophila* pertenece a un

### Study of gene expression induced by environmental changes

*Polytene chromosomes in Chironomus and Drosophila sp. allow the direct microscopic observation of activation/repression processes as a response to environmental changes. They represent a model to study these events, in the nuclear compartment, at cytological and molecular levels.*

1. *Heat-shock response. Besides the heat-shock loci induction, changes at telomeres are observed in Chironomus thummi, with the puffing induction of TBRIII (Telomeric, Balbiani Ring, on the 3R chromosome Morcillo et al., 1988. Chromosoma 96, 139-144). The inducibility of this puff in other, polytenic and non polytenic tissues has been studied (Morcillo et al., 1994. Exp. Cell Res. 211, 163-167), as well as its true identity as a heat-shock locus. In fact, immunocytochemistry using a HSF antibody from Drosophila shows that HSF (heat shock transcriptional factor) is present at TBRIII locus after heat shock (Morcillo et al., 1994. Exp. Cell Res. 211, 163-167). By means of Drosophila antibody against hsp83 (heat, shock protein 83), its product has been allocated at chromosomal locus 93 D in Drosophila (Morcillo et al., 1993. Chromosoma 102, 648-659). In Chironomus the analogous hs 90 locus might be related with the TBRIII (telomeric puff heat inducible). It is interesting that 93 D locus in Drosophila belongs to the so-called -hsrw- genes which lack protein pro-*

tipo de genes *heat shock*, *hsr w* (Lakhotia, 1989. *Genome* 31, 677-683).

2. Regulación de los anillos de Balbiani. El sistema de los anillos de Balbiani (BR), que contiene los genes de las proteínas de secreción salival larvaria, representa un modelo interesante para estudiar la regulación génica por dos motivos. En primer lugar su alta actividad transcripcional que se mantiene durante toda la vida larvaria. Por otra parte, bajo condiciones especiales de tratamiento del medio del cultivo (adición de etanol, glicerol, azúcares) aparecen cambios coordinados en la expresión de los BRs. Como punto de partida para entrar en el estudio de la regulación, se está estudiando, en colaboración con el Prof. A. Nieto del Centro de Biología Molecular, las implicaciones que el extremo carboxi-terminal de los productos codificados por BRs (exon 3' tiene actividad de *DNA binding*). En la actualidad se llevan a cabo estudios de interacción de la proteína producida en un vector de expresión bacteriana, y DNA clonado de los promotores de los BRs (Clones cedidos por el Dr. Wieslander). El objetivo principal es la caracterización del motivo de DNA reconocido por la proteína del exon terminal.

3. Cambios debidos a regulación durante el desarrollo. En este sentido se ha estudiado la región cromosómica III D1 de *Chironomus thummi* que parece contener al menos 2 genes que aparecen asociados como una «superunidad» génica en especies del género *Chironomus* muy alejadas en las que ha habido translocación al cromosoma I. De estos 2 genes, uno se ha identificado como gen de respuesta temprana a ecdisona, homólogo al I-18C (Dorsch-Häsler, 1990. *Gene* 96, 233-239). El otro gen, tiene expresión temprana en el desarrollo embrionario, y se está procediendo a su caracterización molecular.

*duct* (Lakhotia, 1989. *Genome* 31, 677-683).

2. *Balbini ring regulation. BR gene family is an interesting model to study gene regulation for several reasons. On one hand, BR genes have a high transcriptional activity, held all the larval life long. On the other hand, changes on the BR expression pattern appear under special culture conditions, such as sugar or alcohol treatments. The involvement of the BR C-terminal domain in the regulation of the BR family is being studied in a collaboration with Dr. A. Nieto (CBM, Universidad Autónoma Madrid). Preliminary results show DNA binding properties for the expressed C-terminal domain. More specific binding tests between BR1 promoter fragments and the expressed domain are in progress at the moment.*

3. *Changes due to developmental regulation. In this part the chromosomal region III D1 of Chironomus thummi has been studied. This study involves two genes, which seem linked in a kind of «supralocus unit» in Chironomus species. Even in those species where this region was translocated to chromosome I. The two genes keep the linkage one of the genes is the I-18C homologous (Dorsch-Häsle et al., 1990. Gene 96, 233-239), early ecdysone responsive locus. The other gene is expressed since the first stages of development and its genetic characterization is being forwarded.*

**Organismos financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PB87-0256 (Prórroga hasta 1994)

**Publicaciones / Publications**

- Morcillo, G., Díez, J.L., Carbajal, E. and Tanguay, R.M.: HSP90 associates with specific heat shock puffs (hsrw) in polytene chromosomes of *Drosophila* and *Chironomus*. *Chromosoma* 102, 648-659, 1993.
- Stocker, A.J., Gorab, E., Amabis, J.M. and Lara, F.J.S.: A molecular cytogenetic comparison between *Rynchosciara americana* and *Rynchosciara hollaenden*. *Genome* 36, 831-843, 1993.
- Mena, C.G., Testillano, P.S., González-Melendi, P. and Gorab, E.: Immunoelectron microscopy of RNA combined with nucleic acid cytochemistry in plant nucleoli. *Exp. Cell Res.* 212, 393-408, 1994.
- Morcillo, G., Díez, J.L. and Botella, L.M.: Heat shock activation of telomeric sequences in different tissues of *Chironomus thummi*. *Exp. Cell Res.* 211, 163-167, 1994.
- Testillano, P.S., Gorab, E. and Risueño, M.C.: A new approach to map transcription sites at the ultrastructural level. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1-10, 1994.

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

**LUCAS SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**  
Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**LUIS VICENTE HERNÁNDEZ**  
Investigador Asociado  
*Associate Scientist*

**BEGOÑA GRANADINO GOENECHEA**  
Investigadora Contratada  
*Tenure-track Scientist*

**LUIZ OTAVIO FERRAZ PENALVA**  
B. Predoctoral  
*Graduate Student*

**CARMEN DOÑORO VÁZQUEZ (1993)**

**MARÍA FERNANDA RUIZ LORENZO**

**PAULO ROBERTO DA CUNHA**  
(Hasta X-1993)

**PEDRO PABLO LÓPEZ CASAS**  
Pregraduados  
*Undergraduate Students*

**ROSARIO DE ANDRÉS MONTES**

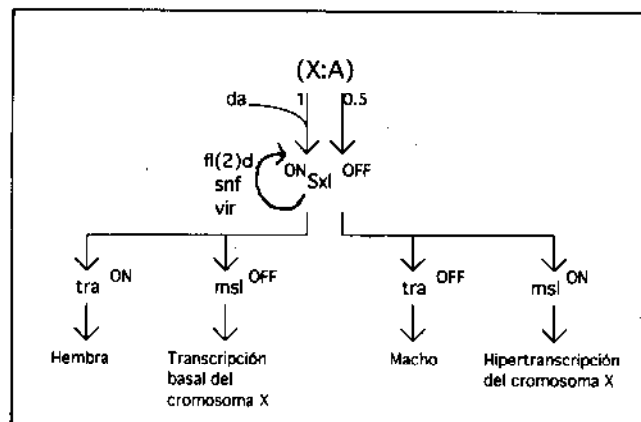
**DOLORES MATEOS MOYA**  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

Nuestro Proyecto se centra en el análisis de los mecanismos que regulan la expresión génica durante el proceso ontogenético. Específicamente, tiene como objetivo el análisis de la determinación sexual y de la compensación de dosis génica (hipertranscripción del cromosoma X de los machos) en *Drosophila melanogaster*. Dicho análisis se lleva a cabo mediante el aislamiento, y posterior caracterización genético-molecular, de mutaciones que alteran dichos procesos. Dos aspectos concretos se abordan: (1) la base genética de la señal X:A que determina el desarrollo sexual y la compensación de dosis genica, y (2) el clonaje y posterior caracterización del gen *fl(2)d*, necesario para el «splicing» específico de hembra de los transcritos del gen *Sex-lethal*. Además, hemos iniciado el aislamiento y posterior caracterización de genes de *Drosophila subobscura* y de *Sciara ocellaris* que son homólogos de los genes que controlan la determinación sexual y/o la compensación de dosis génica en *Drosophila melanogaster*. Resumimos el trabajo realizado: (1) Se ha determinado que el gen *fl(2)d* es necesario para el «splicing» específico de hembra del transcrito del gen *transformer*, mientras que no se necesita para el «splicing» específico de sexo del transcrito del gen *double-sex*. (2) Se continúa con el análisis de complementación de las mutaciones en el gen *fl(2)d*, así como con su caracterización molecular. (3) Se ha aislado y caracterizado el gen de *Drosophila subobscura* que es homólogo del gen *scute* de *Drosophila melanogaster*. (4) Se ha aislado y se está caracterizando el gen de *Drosophila subobscura* que es homólogo del gen *Sex-lethal* de *Dro-*

*The aim of the Project is the understanding of the genetic, and ultimately molecular, mechanisms controlling gene expression during ontogenetic processes. Specifically, we analyse the processes of sex determination and dosage compensation (hypertranscription of the male X chromosome) in Drosophila melanogaster. For this purpose, we search for mutations altering these processes and we carry out the genetic and molecular characterisation of these mutations. The Project consists in the analysis of the X:A signal that controls sex determination and dosage compensation, and in the cloning and further characterisation of the gene fl(2)d that is needed for the female-specific splicing of the Sxl transcripts. Moreover, we initiated the isolation and further characterisation of the genes in Drosophila subobscura and in Sciara ocellaris homologs to the genes controlling sex determination and/or dosage compensation in Drosophila melanogaster. We summarise our work: (1) It has been determined that the gene fl(2)d is required for the female-specific splicing of the RNA from the gene transformer, whereas it is not needed for the sex-specific splicing of the RNA from the gene double-sex. (2) We continue with the genetic complementation analysis of the fl(2)d mutations that we have generated, as well as with their molecular characterisation. (3) The gene scute of Drosophila subobscura has been isolated and characterised. (4) We have isolated and we are studying the gene Sex-lethal of Drosophila subobscura. (5) It has been determined that dosage compensation in Sciara ocellaris takes place by hypertranscription of the single male X chromosome. (6) We have isolated and*

*sophila melanogaster*. (5) Se ha determinado que en *Sciara ocellaris* la compensación de dosis génica ocurre por hipertranscripción del único cromosoma X de los machos. (6) Se ha aislado y se está caracterizando el gen de *Sciara ocellaris* que es homólogo del gen *msl-1* de *Drosophila melanogaster*, el cual está involucrado en la compensación de dosis génica. (7) Se ha determinado que los genes *scute* y *sis-a*, que forman parte de la señal X:A involucrada en la activación del gen *Sex-lethal* en el soma, no se necesitan para la activación de este gen en la línea germinal.

*we are characterising the gene msl-1 of Sciara ocellaris. (7) It has been determined that the genes scute and sis-a, which form part of the X:A signal that activates Sex-lethal in the soma, are not needed to activate this gene in the germ line.*



### Tesinas de Licenciatura / Master Thesis

- Carmen Doñoro Vázquez. El gen *scute* de *Drosophila subobscura*. Universidad Complutense de Madrid, 1993. Directora: B. Granadino Goenechea

### Científicos Invitados / Visiting Scientists

- Prof. A.L.P. Perondini, Departamento de Biología, Instituto de Biociencias, Universidad de Sao Paulo, Brasil. (V a VII-1993).

### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- DGICYT, PB92-0006 (1993-1996).

### Publicaciones / Publications

- Granadino, B., Santamaría, P. and Sánchez, L.: Sex determination in the germ line of *Drosophila melanogaster*: activation of the gene *Sex-lethal*. *Development* 118, 813-816, 1993.
- Da Cunha, P.R., Granadino, B., Perondini, A.L.P. and Sánchez, L.: Dosage compensation in sciarids is achieved by hypertranscription of the single X chromosome in males. *Genetics* 138, 787-790, 1994.
- Sánchez, L., Granadino, B. and Torres, M.: Sex determination in *Drosophila melanogaster*: X-linked genes involved in the initial step of *Sex-lethal* activation. *Devel. Genetics* 15, 251-264, 1994.
- Sánchez, L., Granadino, B. and Vicente, L.: Clonal analysis in hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 204, 112-117, 1994.

# Genética y Dinámica de Zonas Híbridas

## *Genetics and Dynamics of Hybrid Zones*

**EDUARDO TORROJA CAVANILLAS**

Investigador

*Senior Investigator*

En colaboración con la Unidad de Genética del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, se está realizando un estudio genético y poblacional de las zonas híbridas formadas por dos subespecies del Ortóptero *Chorthippus parallelus*: *C.p. parallelus* y *C.p. erythropus*, como un modelo de estudio de zonas híbridas. El análisis se lleva a cabo usando diferentes marcadores cromosómicos obtenidos mediante bandas C y tinción con plata, sobre muestras seriadas de las zonas de contacto.

*In collaboration with the Genetics Unit of the Biology Department of the Universidad Autónoma de Madrid we are investigating the genetic and poblational dynamics of the contact zones formed by two subspecies of the Orthoptera Chorthippus parallelus: C.p. parallelus and C.p. erythropus, as a model to analyze hybrid zones. The study has been carried out using different chromosome markers obtained by C-banding and silver staining on serial samples collected on the hybrid zones.*

### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- PGC, PB90-0192
- CEE, CE93-0008

### **Publicaciones / Publications**

- Buño, I., Torroja, E., López-Fernández, C., Butlin, R.K., Hewit, G.M. and González, J.: A hybrid zone between two subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus* along the Pyrenees: the west end. *Heredity* 73, 626-634, 1994.



# Biología Molecular de la Gametogénesis

## Molecular Biology of Gametogenesis

---

**JESÚS DEL MAZO MARTÍNEZ**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**DULCE M. LÓPEZ ALAÑÓN (1993)**

**LUIS A. LÓPEZ FERNÁNDEZ**

**MARIO PÁRRAGA SAN ROMÁN**

(Desde IX-1993)

**VICTOR F. GROB VILLA (1994)**

**JUAN C. ORTEGA LÁZARO**

(Desde XI-1993)

**OSCAR DE LUIS JIMÉNEZ**

(Desde VI-1994)

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**FERNANDO ESCOLAR ANTÚNEZ**

(Desde XI-1994)

Personal Técnico

*Technical Staff*

---

La formación de gametos es un proceso de diferenciación terminal, que conlleva múltiples mecanismos de regulación y está generado a través de sistemas evolutivamente conservados, como la meiosis. Nuestro interés se centra en el aislamiento y caracterización de genes implicados en dicho proceso. Para ello, se ha partido de la creación de distintas genotecas direccionales de cDNA correspondiente a transcritos procedentes de línea germinal masculina y femenina de ratón. Así, se han construido genotecas de cDNA en fagos  $\lambda$  ZapII a partir de ovario fetal de los días 16 y 17 del desarrollo prenatal, donde se inicia el proceso meiótico en hembras de mamífero. Paralelamente, con el objetivo de aislar genes expresados durante la espermatogénesis temprana, se ha llevado a cabo la creación, mediante tecnología paramagnética, de genotecas de sustracción de cDNA de testículo prepúber. La selección de clones correspondientes a genes expresados preferencialmente en gametogénesis, se ha llevado a cabo por análisis diferencial mediante sondas de ssDNA correspondientes a tejidos o estadios del desarrollo gametogénico frente a sondas de tejidos somáticos.

Se han aislado clones de secuencia homóloga a genes conocidos tanto en ratón como en otras especies, entre los que cabe mencionar la histona *H3.3A*, *Ahd-2*, *UbCEP*, *PABP*, *rab-1*, con los que estamos avanzando en el análisis de sus funciones y regulación durante la gametogénesis. Nuestro interés se ha centrado fundamentalmente en la caracterización de genes novedales y especialmente aquellos de expresión específica en li-

*The formation of gameta is a process of terminal differentiation which includes multiple regulatory mechanisms, and it is generated by evolutionary conserved mechanisms, such as meiosis. Our interest is focused on the isolation and characterization of genes involved in this process. For that, we have prepared different directional cDNA libraries, corresponding to transcripts from both male and female mouse germ line. We have constructed cDNA libraries in  $\lambda$  ZapII phages from fetal ovaries from 16 and 17 days of prenatal development, where the meiotic process begins in mammalian female. With the aim to isolate genes expressed on early spermatogenesis, we also generated subtractive cDNA libraries from prepuberal testis. Clones corresponding to genes preferentially expressed in gametogenesis were selected by a differential screening method using ssDNA probes from gametic tissues versus somatic ones.*

*Clones with sequence homology with known genes, both in mouse and other species were isolated, such as H3.3A histone, Ahd-2, UbCEP, PABP, rab-1. We are progressing in the analysis of its role and regulation during gametogenesis. Our interest is focused on the characterization of novel genes and mainly in those with specific expression on germ line. In addition to sequencing of the cDNAs, we are studying the regulation of their expression during the differentiation to the gamete by RT-PCR, developmental Northern, in situ hybridization and run-off techniques both in tissues and cell isolated subpopulations. In some genes, we have started the characterisation of the gene*

nea germinal. Además de la secuenciación de los cDNAs, se ha analizado la regulación de su expresión durante la diferenciación a gametos, tanto mediante técnicas de RT-PCR, Northern durante el desarrollo, hibridación *in situ* y run-off, tanto en tejidos como en subpoblaciones celulares aisladas. Para alguno de estos genes hemos iniciado la caracterización de sus productos génicos, como el del gen denominado *Geg-154* que codifica para una proteína de 35 KD de la que hemos obtenido anticuerpos mediante inmunización con proteínas de fusión. Nuestros resultados indican que se localiza específicamente espermatoцитos desde estadios paquítenicos. Asimismo, hemos comprobado su conservación genética evolutiva, incluyendo *Drosophila* y levadura, con lo que se prevén abordajes funcionales en estas especies modelo. Estamos trabajando en la generación de ratones transgénicos con construcciones antisense y promotores específicos de espermatoцитo.

Otros genes específicos de línea germinal, entre los que inicialmente clonamos, muestran posibles elementos de regulación característicos. Así, el denominado *Teg-271*, posee una región de 113 pb en 3'UTR con homología reversa y complementaria a una región conservada en mamíferos, también en 3'UTR, de un gen de expresión testicular relacionado con el antígeno H-Y, el *Mea* (*male enhanced antigen*). Estamos estudiando el papel funcional de dicha región así como la interacción de los dos loci, localizados en el cromosoma 17 de ratón y en el 6 humano.

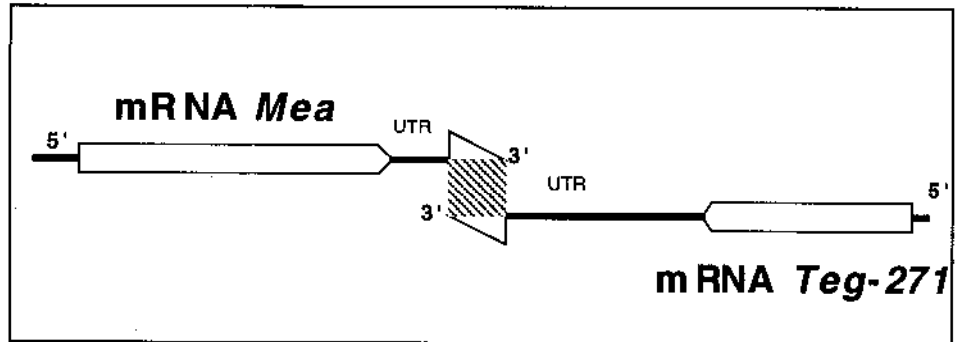
Además de continuar la caracterización molecular y funcional de algunos de estos genes clonados, nuestro interés se amplía a la búsqueda de genes homólogos por una parte en humanos, y por

*product. That is the case of the called Geg-154 coding for a 35 KD protein from which we have obtained antibodies by immunisation with fusion proteins. Our results also show a specific location of this protein in spermatocytes from pachytene stage and follicular cells in ovary. We have also demonstrated its genetic evolutionary conservatton, including Drosophila and yeast. Therefore, we are preparing functional approaches using these model species. Generation of transgenic mice using antisense and spermatocytes promoter constructs are also being carried out.*

*Other specific genes of the germ line, among the genes initially cloned, show possible particular regulatory elements. Thus, the called Teg-271 has a region of 113bp at 3'UTR with reverse and complementary homology in a 3'UTR conserved region in mammals, corresponding to a gene of testis expression related to the H-Y antigen: Mea (male enhanced antigen). We are studying the function of such region as well as the interaction of both loci, located on the mouse chromosome 17 and in chromosome 6 in humans.*

*In addition to continuing the molecular and functional characterization of the cloned genes, our interest is to extend the search for homologous genes to both human and model eukaryotes. This will allow us to progress in the genetic and functional analysis that we are achieving in mouse and human. Also we have initiated some collaborations in the development of in vitro culture systems of germ line, which would allow us to design functional experiments that at present are not easy to perform due to their being practically inexistent.*

otra en Eucariotes modelo que permitan incrementar el análisis genético y funcional que estamos llevando a cabo en ratón o en humano. Por otra parte se han iniciado colaboraciones en el desarrollo de sistemas de cultivo in vitro de línea germinal, que nos posibilite experimentos funcionales que hasta hoy no son planteados, dada la práctica inexistencia de tales sistemas.



### Tesis Doctorales / Doctoral Thesis

- Dulce M. López-Alañón. Aislamiento y caracterización de genes expresados durante la gametogénesis en ratón. Universidad Complutense de Madrid, 1993. Director: J. del Mazo.
- Luis A. López-Fernández. Clonaje y caracterización de genes implicados en la gametogénesis temprana de ratón. Universidad de Alcalá de Henares, 1994. Director : J. del Mazo.

### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- DGICYT, PB89-0053 (1990-1993)
- DGICYT, PB92-0063 (1993-1996)
- CAM, C077/91
- Programa bilateral CSIC-CNR (Italia)

### Publicaciones / Publications

- López-Fernández, L.A. and del Mazo, J.: Construction of subtractive cDNA libraries from limited amounts of mRNA and multiple cycles of subtraction. *BioTechniques* 15, 654-658, 1993.
- Del Mazo, J., Prantera, G., Torres, M. and Ferraro, M.: DNA methylation changes during mouse spermatogenesis. *Chromosome Res.* 2,147-152, 1994.

### Próximos Artículos / Forthcoming Papers

- López-Alañón, D.M. and del Mazo, J.: Cloning and characterization of genes expressed both in female and male mouse gametogenesis *J. Reprod. Fertil.* (in press).

# Biología de la Reproducción

## Biology of Reproduction

---

**PEDRO ESPONDA FERNÁNDEZ**  
Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**JORGE CUADROS FERNÁNDEZ**  
**MARTA RIFFO DUARTE**  
B. Postdoctorales  
*Postdoctoral fellows*

**MERCEDES GARCÍA GILA**  
**EVA HUGUET GUTIÉRREZ**  
**MARTA MORENO GONZÁLEZ**  
(Hasta I-1993)

**MARIO PÁRRAGA SAN ROMÁN**  
(Hasta IX-1993)  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**ASCENSIÓN GONZÁLEZ DÍAZ**  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

---

Se han analizado diversos factores que participan en el proceso reproductivo de algunos mamíferos, así como también de algunas especies exóticas. Se han estudiado con especial interés los cambios que ocurren en el espermatozoide durante su maduración en el tracto masculino, así como las alteraciones que le suceden a este gameto durante los periodos previos a la fecundación. Se ha intentado conocer las funciones de algunas de las proteínas secretadas por el tracto masculino (epidídimo, próstatas, vesículas seminales) que están relacionadas con cambios moleculares en la superficie del espermatozoide. Respecto a estas secreciones, se ha apreciado que algunas se asocian a regiones definidas de la membrana plasmática del gameto masculino, donde cumplirían funciones relacionadas con el control de la fecundación. De lo anterior se desprende que el análisis de estas proteínas nos puede conducir a conocer mejor los mecanismos de control de la fecundación.

Por otra parte, se ha analizado *in vivo* la relación existente entre los espermatozoides almacenados en las criptas oviductales con el fenómeno de la reacción acrosomal, que ocurre antes de la fecundación. Al respecto, se ha sugerido que la acción de las criptas (más probablemente de sus secreciones) sobre los gametos, sería un escalón importante dentro de la secuencia de hechos que deben ocurrir para que la fecundación sea un éxito.

Por último, se ha comenzado a estudiar la criticada capacidad del espermatozoide para captar genes foráneos. Para lo cual se desarrollan actualmente métodos inéditos, que intentan verificar esta posibilidad del gameto de los mamíferos.

*We attempted to analyze diverse features connected to the reproductive mechanism in some mammals, as in other more exotic species. A particular attention has been devoted to spermatozoon maturation phenomena which occur when the male gamete pass through the male genital tract; as well as to the membrane changes occurring when the gamete is in the female genital tract just before fertilization. The probable functions of various proteins secreted by the male tract (epididymis, prostates, seminal vesicles) have been studied. In this regards, we noticed that some specific proteins which bind to specific regions of the spermatozoon plasma membrane, play important roles related with the success of fertilization. Then, it seems critical to investigate these proteins in order to fulfill the knowledge on fertilization phenomenon. We have also studied the relationship between spermatozoon stored in the oviductal crypts and the progress of the acrosomal reaction, and it seems that the crypts play an important role in the succession of phenomena that occur in the spermatozoon before to fertilize the oocyte.*

*Furthermore, we began to analyze the discussed faculty of the spermatozoon as vector of foreign genes. In this sense, we are working in new procedures trying to corroborate this probable capacity of the male gamele.*

**Tesis Doctorales / Doctoral Thesis**

- Marta Riffo Duarte. Función de la Fosfolipasa A2 durante la reacción acrosómica, la interacción espermatozoide-ocito y la implantación embrionaria en mamíferos. Universidad Autónoma de Madrid, 1993. Director: P. Esponda.
- Jorge Cuadros Fernández. Estudio del nucleolo y de los cuerpos precursores nucleolares durante la gametogénesis y la embriogénesis temprana del ratón: análisis mediante métodos inmunocitoquímicos y de microinyección de anticuerpos. Universidad Autónoma de Madrid, 1993. Directores: P. Esponda y M.R. Carballada.

**Científicos Invitados / Invited Scientists**

- Prof. Eduardo Bustos Obregón. Universidad de Chile (VII-1993).
- Dr. Marcelo Cabada. Universidad de Rosario, Argentina (IX-1994).
- Dra. Rosa Guerra Muñoz. Universidad de Valparaíso, Chile (IX a XI 1993, 1994).
- Lda. Mariana Rojas Rauco. Universidad de Chile (IX a XI 1993, 1994).

**Organismos financiadores / Fundings Agencies**

- DGICYT, PB090-0068 (1992-1994)
- CEE CI1-CT92-0022 (1993-1996)

**Publicaciones / Publications**

- 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, 61-18, 1993.
- Regalado, F., Esponda, P. and Nieto, A.: Temperature and androgens regulate the biosynthesis of secretory proteins from rabbit cauda epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 448-453, 1993.
- Guerra, R., Campos, B. and Esponda, P.: Analysis of spermatozoa of four bivalves with particular reference to the acrosome and plasma membrane glycoproteins. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 26, 489-495, 1994.
- Moreno, M., Esponda, P.: Acrosomal status of mouse spermatozoa stored in the oviductal isthmus after natural mating. En: *Symposium on Spermatology* (Eds.) M. Bradley and J. Cummins. Cairns. North Queensland, pp. 105-106, 1994.

# Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados

## *Growth Factors in Vertebrate Development*

**FLORA DE PABLO**

Jefe de Grupo

*Group leader*

**ENRIQUE J. DE LA ROSA**

Investigadores

*Senior Investigators*

**BEATRIZ PÉREZ VILLAMIL**

(Hasta I-1994)

**PILAR R. GONZÁLEZ GUERRERO**

(Hasta I-1994)

**CATALINA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ**

(Hasta I-1994)

B. Postdoctorales

*Postdoctoral Fellows*

**ANA LÓPEZ CARRANZA**

**AIXA V. MORALES**

**JOSÉ SERNA**

**BELÉN PIMENTEL** (Desde VII-1994)

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**ELENA MARTÍNEZ**

Personal Técnico

*Technical Staff*

### **Papel de los factores de crecimiento en el desarrollo embrionario temprano y la neurogénesis**

Los procesos biológicos del desarrollo en vertebrados se producen mediante señalización extracelular sobre células que progresivamente adquieren características intrínsecas distintas. Nosotros estudiamos un grupo de estas señales, los factores de crecimiento, especialmente los de la familia de la insulina/factores de crecimiento insulina-like (IGFs). Pretendemos caracterizar, a niveles molecular, celular y del organismo, su papel en el desarrollo embrionario. Hemos demostrado que, además de su conocida función postnatal metabólica, la insulina y el IGF-I, tienen efectos proliferativos y diferenciativos, esenciales desde los primeros estadios del desarrollo. Un aspecto importante a investigar son las posibles interacciones de estos factores dentro de redes y cascadas señalizadoras con otros factores. Nuestros estudios actuales se centran en las siguientes áreas:

**a) Expresión y acción autocrina/paracrina de la insulina prepancreática.** El gen de la preproinsulina está expresado durante la gastrulación y neurulación del embrión de pollo, demostrado por RT-PCR e hibridación *in situ*. Su regulación temporal y espacial son distintas que las del gen de IGF-I, que aparece más tarde en la ontogenia (hecho también hallado en el embrión de *Xenopus*). La expresión en múltiples áreas del embrión del mRNA de preproin-

### ***Role of growth factors in early development and neurogenesis.***

*Developmental processes in vertebrates evolve by extracellular signaling on cells that progressively acquire intrinsic distinct characteristics. We study a group of these signals, the growth factors, with particular focus on the insulin/insulin-like growth factors (IGFs) family. We pursue the characterization, at molecular, cellular, and whole organism levels, of the role of these factors in embryonic development. We have demonstrated that, in addition to their known postnatal metabolic function, insulin and IGF-I have proliferative and differentiative effects, essential from very early development. Important aspects to explore are the likely interactions of these factors within signaling networks and cascades with other growth factors. Our current studies address the following areas:*

**a) Expression and autocrine/paracrine action of prepancreatic insulin.** *The preproinsulin gene is expressed during gastrulation and neurulation in the chick embryo, as demonstrated by RT-PCR and in situ hybridization. Its temporal and spatial regulation is different from the expression of the IGF-I gene, which appears later in ontogeny (a fact also true in Xenopus embryos). The widespread expression of preproinsulin mRNA, similar to the pattern of insulin receptor mRNA, supports the possible physiological function of this signaling system in the processes of cell proliferation*

ulina, similar al patrón mostrado por el mRNA del receptor de insulina, apoya la posible función fisiológica de este sistema de señalización en la proliferación y la diferenciación celular que tienen lugar en el embrión joven. Así, utilizando cultivos de embrión completo en medio definido, hemos demostrado estimulación de la proliferación tras la adición de insulina exógena. Se están evaluando los efectos de la interferencia con la expresión de insulina y su receptor mediante oligonucleótidos *antisense* sobre el ciclo celular, la supervivencia y la diferenciación.

**b) Caracterización de la neurogénesis retiniana y efectos de los factores de crecimiento.** En este sistema modelo estamos analizando el proceso biológico que, a partir de una población de precursores neurales pluripotentes, genera los diferentes tipos de neuronas y glía que constituyen el sistema nervioso central. El anticuerpo monoclonal PM1 define una subpoblación de precursores neurales, lo que pone de manifiesto su heterogeneidad intrínseca. Además, los precursores PM1+ son altamente dependientes de insulina e IGF-I en cultivo. Estamos estudiando poblaciones de células que expresan distintos marcadores, usando enfoques cuantitativos como la citometría de flujo (FACS) e inmunocitoquímica y esperamos definir relaciones entre la capacidad intrínseca celular y las influencias epigenéticas.

**c) Análisis bioquímico y funcional de los receptores tirosina-kinasa del sistema insulina/IGF embrionarios.** La señal de estos factores polipeptídicos es mediada por receptores específicos de membrana que, tras unir (subunidad  $\alpha$ ) el ligando, autofosforilan su subunidad  $\beta$  catalítica y transducen la señal. Hemos

*and differentiation ongoing in the young embryo. Indeed, using whole embryo cultures in defined medium, we have found stimulation of proliferation by exogenously added insulin. We are presently evaluating how the interference with insulin and insulin receptor gene expression by antisense oligonucleotides affects the cell cycle, cell survival and differentiation.*

**b) Characterization of retinal neurogenesis and effects of growth factors.** *In this model system we are analyzing the developmental process that, from a population of pluripotent precursors leads to the different types of neurons and glia that form the central nervous system. The monoclonal antibody PM1 defines a subpopulation of neural precursors, thus reflecting their intrinsic heterogeneity. Further, these PM1+ precursors are highly dependent on the presence of insulin or IGF-I. We are studying populations of cells expressing different markers, using quantitative approaches such as flow cytometry and immunocytochemistry, and we expect to define interrelationships between intrinsic potentialities and modulatory epigenetic influences.*

**c) Biochemical and functional analysis of tyrosine kinase receptors of the insulin/IGF system in embryogenesis.** *The signal of these polypeptidic factors is transduced by specific membrane receptors that upon ligand binding to the  $\alpha$  subunit autophosphorylate their catalytic intracellular  $\beta$  subunit. We have shown that these receptors are ubiquitous and active at very early stages of chick embryogenesis. We are characterizing the ligand binding and tyrosine phosphorylation properties of the receptors that recognize insulin and IGF-I in two representative*

mostrado que estos receptores son ubicuos y activos desde estadios muy precoces de la embriogénesis. Estudiamos actualmente las propiedades de unión de ligandos y autofosforilación de los receptores que reconocen insulina e IGF-I en dos momentos representativos de la neurogénesis, la fase proliferativa y la fase diferenciativa. La presencia de receptores híbridos o atípicos puede permitir explicar los casi equivalentes efectos biológicos de la insulina, su precursor, la proinsulina y el IGF-I. La hiperexpresión de receptores dominantes negativos permitirá el análisis en profundidad de la contribución relativa del receptor de insulina respecto al receptor de IGF-I sobre la proliferación, supervivencia y diferenciación celular *in vivo*.

*moments of neurogenesis, during proliferative and differentiative stages. The presence of atypical or hybrid receptors may explain the almost equipotent biological effects of insulin, its precursor proinsulin and IGF-I in neuroretina. The hyperexpression of dominant negative mutant receptors will permit the analysis more in depth of the relative contribution of the insulin receptor vs. the IGF-I receptor on proliferation, differentiation and survival in vivo.*

#### **Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Prof. Ángel Peña, Dpto. de Ciencias Morfológicas. Universidad Complutense. Madrid

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PM 92/0017 (1992-1995)
- FIS, 91/0218 (1991-1993); 94/151 (1994-1996)
- CAM, AE00036/94 (1994)
- Fundación Alexander von Humboldt /CSIC (AE 1994)

#### **Publicaciones / Publications**

- De Pablo, F., Pérez-Villamil, B., Serna, J., González-Guerrero, P.R., López Carranza, A., De la Rosa, E.J., Alemany, J. and Caldés, T.: IGF-I and IGF-I receptors in development of nonmammalian vertebrates. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 427-433, 1993.
- De Pablo, F. and Heyner, S.: Analysis of hormones and receptors in embryogenesis. In: *Handbook of Endocrine Research Techniques* (Eds., F. de Pablo, C.G. Scanes and B. Weintraub). Academic Press, Inc., Orlando, Florida pp. 567-588, 1993.
- De Pablo, F.: An introduction to vertebrate endocrinology. In: *The Endocrinology of Growth, Development and Metabolism in Vertebrates* (Eds., M.P. Schreibman, C.G. Scanes P.K.T. Pang). Academic Press Inc., Orlando. pp. 1-11, 1993.
- Rodríguez-Tébar, A., De la Rosa, E. J. and Arribas, A.: Neurotrophin-3 receptors in the developing chick retina. *Eur. J. Biochem.* 211, 789-794, 1993.
- Serrano, J., Scavo, L., Roth, J., De la Rosa, E. J. and De Pablo, F.: A novel chicken homeobox-containing gene expressed in neurulating embryos. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 190, 270-276, 1993.



- Yang, Y.W.H., Brown, D.R., Robcis, H.L., Rechler, M.M. and De Pablo, F.: Developmental regulation of insulin-like growth factor binding protein-2 in chick embryo serum and vitreous humor. *Reg. Pep.* 48, 145-155, 1993.
- De la Rosa, E.J., Arribas, A., Frade, J.M. and Rodríguez-Tébar, A.: Role of neurotrophins in the control of neural development: Neurotrophin-3 promotes both neuron differentiation and survival of cultured chick retinal cells. *Neuroscience* 58, 347-352, 1994.
- De la Rosa, E.J., Bondy, C.A., Hernández-Sánchez, C., Wu, X., Zhou, J., López-Carranza, A., Scavo, L.M. and De Pablo, F.: Insulin and Insulin-like growth factor system components gene expression in the chicken retina from early neurogenesis until late development and their effect on neuroepithelial cells. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1801-1810, 1994.
- De Pablo, F., Dashner, R., Shuldiner, A.R. and Roth, J.: *Xenopus laevis* oocytes, eggs and tadpoles contain immunoreactive insulin. *J. Endocrinol.* 141, 123-129, 1994.
- Hernández-Sánchez, C., Frade, J.M. and De la Rosa, E.J.: Heterogeneity among neuroepithelial cells in the chick retina revealed by immunostaining with monoclonal antibody PM1. *Eur. J. Neurosci.* 6, 105-114, 1994.
- Pérez-Villamil, B., De la Rosa, E.J., Morales, A.V. and De Pablo, F.: Developmentally regulated expression of the proinsulin gene in the chicken embryo during gastrulation and neurulation. *Endocrinology* 135, 2342-2350, 1994.

#### Próximos Artículos / Forthcoming Articles

- De Pablo, F. and De la Rosa, E.J.: The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends Neurosci.*, 18, 143-150, 1995.

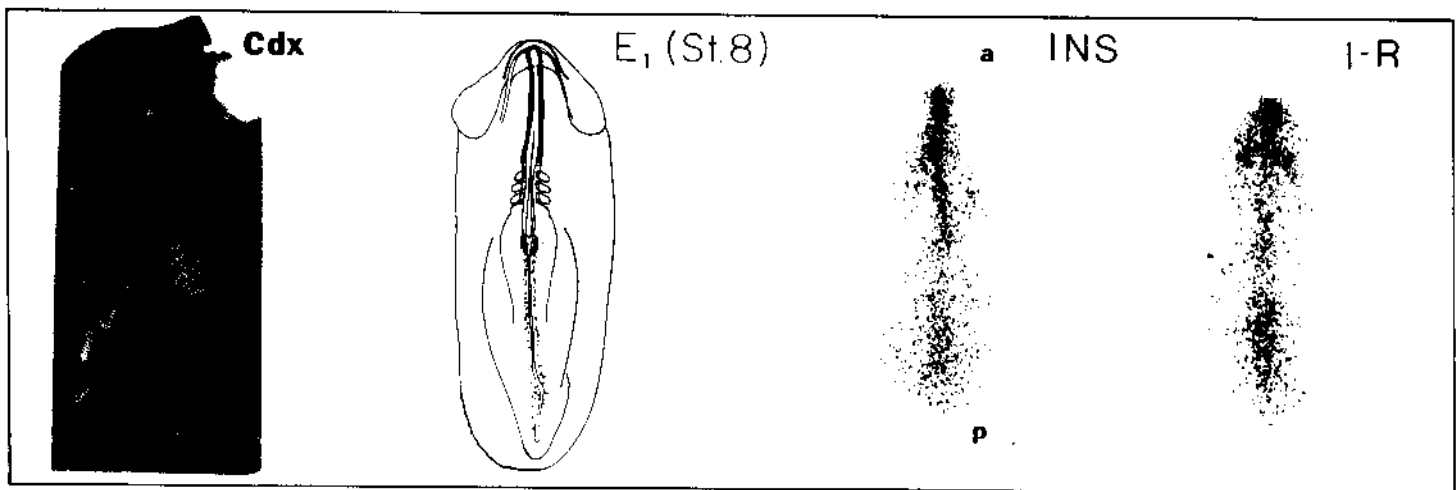


Figura: Patrones diferenciales de expresión génica durante el desarrollo del embrión de pollo. Embriones E1 (aproximadamente 24 horas de incubación), en esquema en el segundo panel, fueron hibridados *in toto* con una ribosonda marcada con digoxigenina para el gen homeótico *Cdx* (experimento realizado por Aixa V. Morales) o con ribosondas marcadas con  $^{32}\text{P}$  para los genes de la insulina y del receptor de insulina (Pérez-Villamil *et al.* 1994). Mientras que *Cdx* está expresado exclusivamente en la región caudal del embrión, la insulina y su receptor están expresados de forma difusa.

Figure: Different developmental patterns of gene expression in early chick embryos. E1 (24 hours of incubation) embryos, schematized on the second panel, were hybridized *in toto* with a digoxigenin labeled riboprobe for a homeobox gene (*Cdx*) (experiment performed by Aixa V. Morales) or  $^{32}\text{P}$  labeled riboprobes for the insulin and insulin receptor genes (Pérez-Villamil *et al.* 1994). While *Cdx* is exclusively expressed in the caudal region of the embryo, insulin and its receptor are diffusely expressed.

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE PLANTAS**  
**DEPARTMENT OF PLANT BIOLOGY**

---

Jefe de Departamento <i>Department Head</i>	<b>PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ</b>
Investigadores / <i>Scientists</i> Profesores de Investigación:	<b>PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ</b> <b>JOSÉ RAMÓN DÍAZ RUIZ</b> <b>DIONISIO LÓPEZ ABELLA</b>
Investigadores Científicos:	<b>RAMONA BELTRÁ MARTINEZ DE VELASCO</b> <b>M.<sup>a</sup> ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ GÓMEZ</b> <b>M.<sup>a</sup> CARMEN RISUEÑO ALMEIDA</b> <b>FCO. JAVIER PAZ-ARES RODRÍGUEZ</b> <b>JOSÉ J. SÁNCHEZ SERRANO</b>
Colaboradores Científicos:	<b>CARMEN CASTRESANA FERNÁNDEZ</b> <b>ISABEL GARCÍA LUQUE</b> <b>CARMEN GUTIÉRREZ MARTÍN</b> <b>FCO. JAVIER MEDINA DÍAZ</b> <b>SUSANA MORENO DÍAZ DE LA ESPINA</b> <b>ELÍAS MANUEL ROBLES CHILLIDA</b> <b>M.<sup>a</sup> TERESA SERRA YOLDI</b>
Secretaría:	<b>M.<sup>a</sup> VICTORIA LAFITA TOGORES</b>

---

# Biología Celular y Molecular Vegetal

## Plant Cell and Molecular Biology

---

**M.<sup>a</sup> ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ  
GÓMEZ**

Jefe de Grupo  
*Group Leader*

**FCO. JAVIER MEDINA DÍAZ  
SUSANA MORENO DÍAZ DE LA ESPINA**  
Investigadores  
*Senior Investigators*

**ANTONIO CERDIDO ANCEL**  
(Hasta VI-93)

**PALOMA HERGUIDO HERGUIDO**  
(Hasta III-94)

**M.<sup>a</sup> ASUNCIÓN MEDINA DÍAZ  
ANA MÍNGUEZ GARRIDO**

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**NIEVES FONTURBEL CABAÑAS  
MERCEDES CARNOTA ROMERO**  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

---

**Biogénesis de los ribosomas y proliferación celular.** La Biogénesis de los Ribosomas es una función celular fundamental, que se expresa en una estructura nuclear prominente y general de las células eucarióticas: el nucléolo. La tasa de expresión de los genes ribosómicos es una medida directa del grado de proliferación celular. Nuestro interés se centra en el estudio del papel funcional de proteínas nucleolares, tanto en la propia regulación de la biogénesis de los ribosomas, como en los mecanismos de control del crecimiento y la división celular. Para ello, identificamos proteínas relevantes, unas conservadas evolutivamente (fibrilarina, nucleolina,...) y otras específicas de plantas, en fracciones nucleares de células en diferente estado proliferativo y estudiamos su patrón de fosforilación por kinasas específicas (cdc2 kinasa, caseína kinasa II). Además, caracterizamos la ultraestructura del nucléolo durante el ciclo celular, combinada con la inmunolocalización cuantitativa de estas proteínas.

**Técnicas microscópicas basadas en microondas.** La utilización de irradiación por microondas permite mejorar considerablemente muchas técnicas preparativas para microscopía. Estamos realizando avances sustanciales en fijación y tinción citoquímica e inmunocitoquímica, estudiando efectos específicos de las microondas en la preservación estructural y en la retención de la antigenicidad de tejidos biológicos, tanto para su utilización convencional, como para su aplicación en experimentos a bordo de naves espaciales.

**Ribosome biogenesis and cell proliferation.** Ribosome Biogenesis is a fundamental cellular function, which is expressed in a prominent nuclear structure, common in all eucaryotic cells - the nucleolus. The rate of ribosomal gene expression is a direct estimate of the cell proliferation status. Our interest aims at the study of the functional role of nucleolar proteins, in the regulation of ribosome biogenesis itself, as well as in the mechanisms of control of cell growth and division. For this purpose, we identify relevant proteins, either evolutionarily conserved (fibrillarlin, nucleolin,...) or specific for plants, in nuclear fractions of cells having different proliferation status, and we study their phosphorylation pattern by specific kinases (cdc2 kinase, casein kinase II). Furthermore, we characterize the ultrastructure of the nucleolus throughout the cell cycle, in combination with the quantitative immunolocalization of these proteins.

**Microscopical techniques based on microwaves.** Microwave irradiation allows a considerable improvement of many preparative techniques for microscopy. We are carrying out substantial advances in fixation, as well as in cytochemical and immunocytochemical staining, and we are studying microwave-specific effects on structural preservation and on the retention of antigenicity in biological tissues. Improved methods will be of application in conventional routine uses, and also in experiments carried out in space installations.

**Nuclear matrix and nucleoskeleton.** The nuclear matrix (NM) defines the

**Matriz nuclear y nucleoesqueleto.**

La matriz nuclear (MN) define al conjunto de las fibras altamente insolubles del nucleoesqueleto, proporcionando el soporte físico para el anclaje de los dominios de cromatina, y los complejos de replicación, transcripción y transporte del RNA. Nuestros estudios de organización estructural, composición proteica y asociación de DNA han revelado que la MN de plantas es una estructura heterogénea, de composición compleja, organizada en dominios definidos y homóloga a la de vertebrados. La detección inmunológica de laminas conservadas tipo A y B en la lámina de *A. cepa*, ha sido una importante contribución al conocimiento del nucleoesqueleto de plantas, ya que fue el primer tipo de FI organizados en una estructura esquelética descritos en ellas. La identificación de algunos componentes de los complejos de transcripción y procesamiento de RNA, principalmente nucleolar y de proteínas estructurales de tipo FI, asociados a dominios específicos de la MN, sugiere que las maquinarias de replicación, transcripción y *splicing* estarían asociadas a un nucleoesqueleto más estable que el de vertebrados. Hemos demostrado que existe continuidad física entre la lámina y un sistema fibrilar aún no identificado del citoesqueleto. El estudio de los mecanismos que controlan el funcionamiento integrado del núcleo y citoplasma es muy importante en células vegetales, que son acentriolares y en las que, el núcleo actúa como el principal centro organizador de MTs y sitio de nucleación de F-actina.

**Organización y funcionamiento nuclear en dinoflagelados.** Los Dinoflagelados son eucariotas muy primitivos, con características procariotas, como la

*highly insoluble fibres of the nucleoskeleton providing physical support for the anchorage of the chromatin domains, and also for the replication, transcription and processing machineries. Our studies on the organization protein composition and DNA binding have revealed that the plant NM is a complex structure, organized in defined domains and homologous to that of vertebrates. The detection of conserved types of both A and B lamins in the lamina of A. cepa, has been an important contribution to the characterization of the plant nucleoskeleton, as the first IF-type of proteins organized in a cytoskeletal array described in plants. The identification of some components of the transcription and processing complexes, as well as IF type structural proteins, associated to specific domains of the NM suggest a model for plants in which the replication, transcription and processing machineries would be associated to a nucleoskeleton more stable than that of vertebrates. We have demonstrated a physical continuity between the lamina and a fibrillar cytoskeletal array not yet identified. This is very important for the study of the mechanisms controlling the coordinated functioning of the nucleus and cytoplasm in plant cells which are a centriolar and in which the nucleus is the main MTOC and F-actin nucleation site.*

**Nuclear organization and functioning in Dinoflagellates.** *Dinoflagellates are very old primitive eukaryotes, which present some features of procaryotes as are the lack of histones and nucleosomes, and which are considered to be an evolutive branch independent of the actual eukaryotes. The project focusses in the characterization of the ribonucleoproteic transcription and splicing complexes, and also the analysis of the nuclear ma-*

falta de nucleosomas e histonas, 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, y en el análisis de la matriz nuclear, y su capacidad de reconocer las secuencias «MAR» de otros sistemas eucariotas. Nuestros estudios han revelado la existencia de una MN compleja de tipo eucariota en Dinoflagelados. La presencia de laminas y topo II en ella, así como su capacidad de asociación específica de secuencias MAR heterólogas, confirman que esta estructura juega un papel en la organización del DNA en loops y que los mecanismos que controlan los dos niveles de organización de la cromatina eucariota (nucleosomas y loops) son independientes.

**Análisis y conservación de recursos genéticos vegetales.** En un programa de conservación de especies autóctonas de México, se estudia una especie de selva tropical (*Lacandonia schismatica*) que constituye una discontinuidad macroevolutiva, probablemente relacionada con una alteración de genes homeóticos, y una especie de interés farmacológico *Chirantodendron pentadactylon* utilizada desde la época prehispánica. Estos estudios contribuirán a la homologación de la farmacopea tradicional mejicana, y al conocimiento y catalogación de la biodiversidad de los recursos naturales de este país. En el CIB se efectúa el análisis de la conservación de proteínas nucleares en estas especies americanas en relación con otras monocotiledóneas y dicotiledóneas próximas.

*trix and its ability to bind MAR sequences from other eukaryotes. Our studies have demonstrated the presence of a complex eukaryotic nuclear matrix in Dinoflagellates. The presence of lamins and topoisomerase II, involved in the binding of MAR sequences to the NM as well as the ability to specifically bind heterologous MAR sequences, confirm that this structure plays a role in the organization of the DNA in loops, and that the mechanisms that control the two levels of organization of eukaryotic chromatin (nucleosomes and loops) are independent.*

**Analysis and conservation of plant genetic resources.** *In a program of conservation of autoctonous species of Mexico, the work centres in a wild specie of the tropical forest (Lacandonia schismatica) which constitutes a macroevolutive discontinuity, which could be related with an alteration in homeotic genes, and a specie of pharmacological interest (Chirantodendron pentadactylon) used since the prehispanic period. These studies will contribute to the homologation of the traditional mexican pharmacopoeia, and also to catalogue the diversity of the many unknown natural resources of this country. We are carrying out the analysis of the conservation of nuclear proteins in these american species in relation with other related monocotyledonous and dicotyledonous.*

**Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Dr. Gerardo Vázquez-Nin. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F., México. (VII-1993 y VII-1994).
- Dra. Olga Echeverría. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F., México. (VII-1993 y VII-1994).
- Dra. Susana Franca. Instituto Nacional da Saúde, Lisboa, Portugal. (V y XI-1993 y XII-1994).
- Dr. Marie-Pierre Gulli. Institut de Biologie Cellulaire et de Génétique, CNRS, Toulouse, Francia. (V-1993).

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PB91-0124 (1992-1995)
- European Space Agency (ESA). Contrato ESTEC/9127/90/NL/PB(SC) (1991-1993)
- Convenio CSIC/CONACYT de México (1987-1994)
- Convenio Cooperación Científica CSIC/JNICT de Portugal (1992-1994)
- Acción Integrada Hispano-Francesa HF92-108 (1993)
- Acción Integrada Hispano-Austríaca HU93-026 (1994)

**Publicaciones / Publications**

- Mínguez, A. and Moreno Díaz de la Espina, S.: Immunological characterization of lamins in the nuclear matrix of onion cells. *J. Cell Sci.* 106, 431-439, 1993.
- Moreno Díaz de la Espina, S., Mínguez, A. and Franca, S.: La matriz nuclear una base para la expresión génica y el funcionamiento nuclear. En: *Progresos en Biología Celular*. (Eds.) Becerra, J.M., Pérez Figares, P., Fernández-Llebrez, P. Publicaciones Universidad de Málaga, págs. 401-407, 1993.
- Moreno Díaz de la Espina, S., Medina, M.A., Mínguez, A. and Fernández Gómez, M.E.: Detection of highly phosphorylated nucleo-proteins in plants by bismuth staining at the EM: X-Ray microanalytical SDS-PAGE and immunological determination of its specificity. *Biol. Cell* 77, 297-306, 1993.
- Marco, R., Medina, F.J., Cerdido, A., De Juan, E., Ushakov, I., Manzanares, M. and Maroto, M.: Technological advances in the analysis of the effects of space microgravity on arthropod development: microwave applications in fixation and histoprocessing techniques. In: *Life Sciences Research in Space*. European Space Agency (ESA SP-366). ESTEC, Noordwijk, pp. 153-158. ISBN: 92-9092-306-7, 1994.
- Medina, F.J., Cerdido, A., Maroto, M., Manzanares, M. and Marco, R.: Enhancement of the immunocytochemical detection of antigens by microwave irradiation. Benefits and limitations analyzed in isolated plant nuclei and *Drosophila* embryos in toto. *Histochemistry* 102, 45-50, 1994.
- Mínguez, A., Franca, S. and Moreno Díaz de la Espina, S.: Dinoflagellates have an eukaryotic nuclear matrix with lamin like proteins and topoisomerase II. *J. Cell Sci.* 107, 2861-2873, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles:**

- Cerdido, A. and Medina, F.J.: Subnucleolar locations of fibrillarín and variations in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma*. (in press, 1995).
- Medina F.J., Cerdido, A. and Marco, R.: Microwave irradiation improvements in the silver staining of the nucleolar organizer (Ag-NOR) technique. *Histochemistry*. (in press, 1995).
- Medina F.J., Cerdido, A. and Fernández-Gómez, M.E.: Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarín and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp. Cell Res.* (in press, 1995).
- Moreno Díaz de la Espina, S.: Nuclear matrix isolated from plant cells. In: «Structural and Functional Organization of the Nuclear Matrix». (Eds.) Berezney, R., Jeon J.W. *Int. Rev. Cytol.*, Chap 11, 1995.

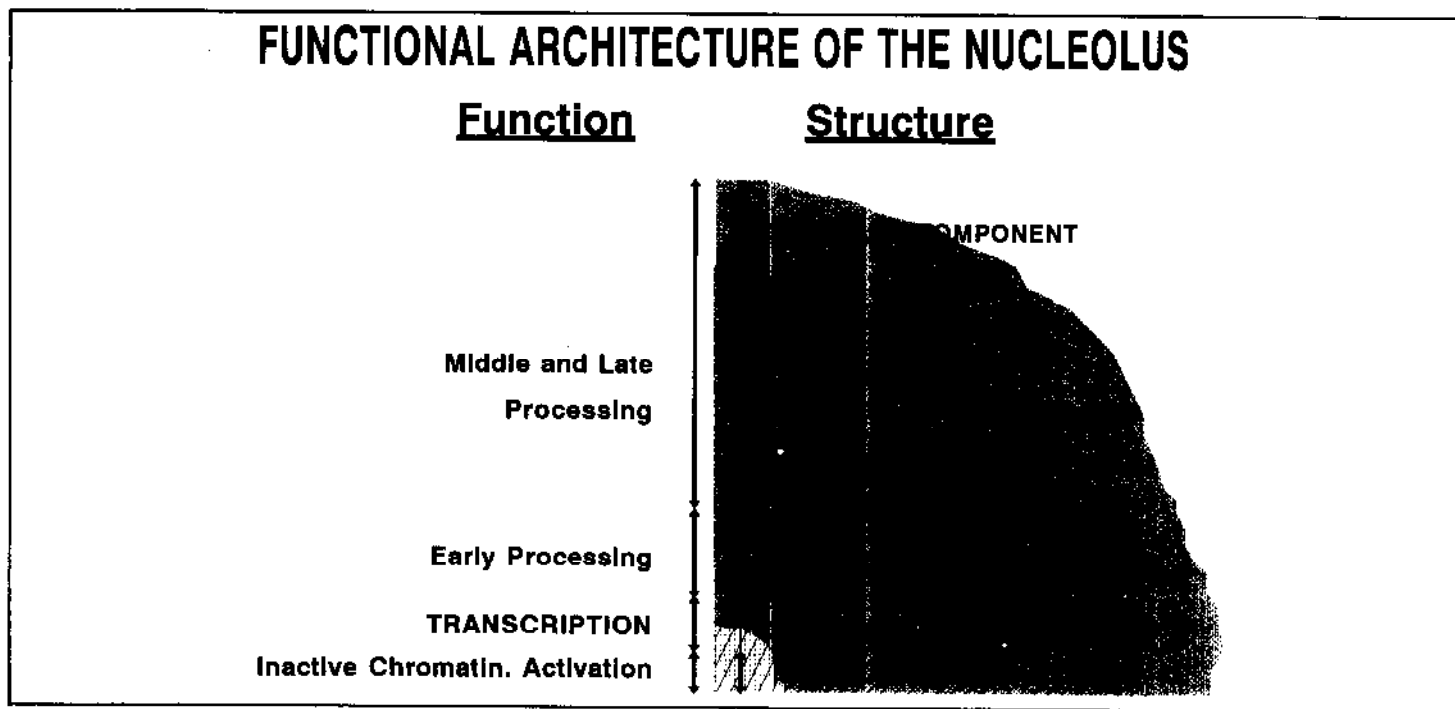


Figura: Modelo de la Arquitectura Funcional del Nucléolo, obtenido de la inmunolocalización ultraestructural del DNA nucleolar (Martín et al., 1989), la RNA polimerasa (Martín y Medina, 1991) y las proteínas nucleolina (Martín et al., 1992) y fibrillarín (Cerdido y Medina, 1995). A la izquierda, bajo el epígrafe «Function», se enumeran las principales etapas de la biogénesis de los ribosomas, confrontadas a la derecha con los subcomponentes estructurales del nucléolo, enumerados y representados esquemáticamente bajo el epígrafe «Structure». La biogénesis de los ribosomas es un proceso vectorial, que genera componentes estructurales de dentro afuera del nucléolo. Sin embargo, las grandes etapas funcionales no necesariamente se correlacionan con componentes morfológicamente distintos. Figura tomada del trabajo: Cerdido y Medina (1995) *Chromosoma*.

Figure: Model of the Functional Architecture of the Nucleolus resulting from ultrastructural immunolocalization of nucleolar DNA (Martín et al., 1989), RNA polymerase (Martín and Medina, 1991), and the proteins nucleolin (Martín et al., 1992) and fibrillarín (Cerdido and Medina, 1995). The main steps of ribosome biogenesis are listed at the left side of the picture, under the heading "Function". Their morphological counterparts, as structural components of the nucleolus, are schematically represented at the right side, under the heading "Structure". Ribosome biogenesis is a vectorial process, gradually producing structural components from the interior of the nucleolus outwards. However, definite functional steps are not necessarily correlated to morphologically distinct components. Reproduced from the paper: Cerdido and Medina (1995) *Chromosoma*.

# Biología Molecular de Plantas

## Plant Molecular Biology

---

**JOSÉ J. SÁNCHEZ SERRANO**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**MARTA MARTÍN BASANTA**

(Desde X-1993)

**GUY VANCANNEYT**

B. Postdoctorales

*Postdoctoral Fellows*

**ENRIQUE ROJO DE LA VIESCA**

(Desde X-1993)

**PEDRO M. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**

(Desde X-93)

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**AILEEN O'CONNOR SÁNCHEZ**

(Desde I-993)

Personal Técnico

*Technical Staff*

**El día 1 de febrero de 1994  
el Grupo se trasladó al Centro  
Nacional de Biotecnología del  
CSIC.**

---

El ácido jasmónico (JA) es un derivado cíclico del ácido linolénico que presenta características típicas de una hormona vegetal. Estudios realizados a nivel molecular y fisiológico indican que esta fitohormona juega un papel primordial en la respuesta de las plantas frente a las heridas. Así mismo se ha visto que JA induce tuberización en patata y que un gran número de los genes que se expresan constitutivamente en los tubérculos son a su vez inducibles por herida en las hojas de la planta. El proyecto que nos proponemos llevar a cabo es el aislamiento y caracterización de los genes que intervienen en la síntesis de JA y en su cadena de percepción que lleva a la activación de genes involucrados en la defensa de la planta o en la formación de tubérculos en patata.

Para llevar a cabo nuestro objetivo nos proponemos obtener líneas transgénicas de patata y *Arabidopsis thaliana*, donde los niveles endógenos de los enzimas que intervienen en la síntesis de JA hayan sido modificados, mediante transformación con los cDNAs que los codifican y su expresión en la orientación correcta o reversa. Se analizará en dichas plantas transgénicas el efecto que la variación resultante en la concentración endógena de JA tenga en su respuesta frente a heridas o en los requisitos para la tuberización de las patatas transgénicas.

Por otro lado, estamos aislando, a partir de una población de semillas de *A. thaliana* mutagenizadas por tratamiento químico o inserción de T-DNA, plántulas que no reaccionan al tratamiento con JA para, con su ayuda, determinar los pasos que constituyen la cadena de percepción de esta fitohormona.

*Plants react to mechanical wounding by activating the transcription of a set of genes, the function of which is mainly devoted to wound healing and prevention of subsequent pathogen attacks. Available physiological and molecular data suggest a role for jasmonic acid, a cyclopentanone derivative of linolenic acid, as an intracellular signal involved in the plant's response to mechanical wounding. However, the role of JA during plant development remains largely unknown. It has been shown to induce tuber formation in potato. Interestingly, a number of genes constitutively expressed in potato tubers are also induced in the plant foliage upon wounding. Our project aims to elucidate the role of JA in plant development and its involvement in the wound-signal transduction pathway.*

*Overexpression of cDNAs coding for enzymes involved in JA biosynthesis in sense and antisense orientation is being used to modulate the endogenous JA concentration in transgenic Arabidopsis thaliana and potato plants, and the effect of altering the JA level on plant development and wound response will be analysed. In order to dissect and biochemically characterise the different steps of the JA signal transduction pathway, A. thaliana JA-insensitive and underproducing mutants are being isolated.*



**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CICYT, (1992-1993)
- Consejería de Educación, CM (1992-1995)
- Acciones Integradas Intercambio MEC/Bundesministerium für Forschung und Technologie, Alemania (1993)
- Comisión Mixta Hispano-Alemana, Intercambio CSIC-Max Planck Institut, Alemania (1993-1994)
- CE, Programa de Biotecnología (1993-1996)
- CICYT (1993-1996)

**Publicaciones / Publications**

- Sánchez-Serrano, J.J., Amati, S., Dammann, C., Ebner, M., Herbers, K., Hildmann, T., Lorberth, R., Prat, S. and Willmitzer, L.: Proteinase inhibitors in the potato response to wounding. In: *Biotechnology in Plant Disease Control*. I. Chet (Ed.) Wiley-Liss, New York, USA, pp. 157-173, 1993.

# Biología Molecular de la Resistencia Vegetal

## Molecular Biology of the Plant Resistance

**CARMEN CASTRESANA FERNÁNDEZ**  
Jefe de Grupo - Investigadora  
*Group leader - Senior Investigator*

**ELENA ALONSO BÁRCENAS**  
B. Postdoctoral  
*Postdoctoral Fellow*

**JUAN IGNACIO MORENO MOZO**  
**PATRICIA OBREGÓN CALDERÓN**  
**ANA SANZ HERRERO**  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**EMILIANA LIÉBANA ALLENDE**  
(Hasta II-1993)  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

**El día 1 de febrero de 1994**  
**el Grupo se trasladó al Centro**  
**Nacional de Biotecnología**  
**del CSIC.**

El interés de nuestro trabajo 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 activación de una reacción de defensa vegetal. Por ello, hemos concentrado nuestra atención en la caracterización de dos de los procesos más relevantes de dicha respuesta, como son: (i) la inducción de la expresión de los genes de defensa vegetal, y (ii) la muerte celular que ocurre alrededor de la zona de infección provocando la aparición de pequeñas lesiones necróticas denominadas lesiones hipersensibles.

(i) El estudio de los mecanismos de regulación que controlan la inducción de la expresión génica durante la reacción de defensa vegetal está siendo realizado mediante determinación de las características de expresión de los genes  $\beta$ -1,3-glucanasa, pertenecientes a un grupo de proteínas denominadas proteínas «PR» o «pathogenesis-related proteins». La presencia de estas proteínas 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. La familia de enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasas está constituida, al menos, por cuatro grupos de isoenzimas diferentes, que han sido clasificadas de acuerdo a su secuencia, su pI, y su localización celular. Con este proyecto nos proponemos, determinar las características de expresión de distintos isoenzimas, básicos y ácidos, localizados respectivamente en las vacuolas y en los espacios intercelulares de la planta, así como, identificar los elementos reguladores que actúan en «cis» y «trans» con-

*Our interest concerns the study of the plant cellular processes which take place in response to pathogen infection and leads to a plant defense response. To achieve this goal we will pursue our studies on the characterization of two relevant aspects of this plant response such as: (i) induction of expression of the defense related-genes, and (ii) identification of the factors involved in the cellular death that takes place around the infection area provoking the formation of the small necrotic lesions.*

(i) *To study the regulatory mechanisms controlling induction of gene expression we selected a family of genes encoding hydrolytic enzymes with  $\beta$ -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 which induction in the plants is commonly associated with the establishment of an incompatible interaction. The analysis of  $\beta$ -1,3-glucanases have allowed to identify different isoforms classified according to their amino acid sequence, pI, and sub-cellular location. We plan to determine the expression characteristics of different isoforms, basic and acidic, and to identify the «cis» and «trans» regulatory elements involved in induction of gene expression during the plant defense reaction. In addition, the regulatory sequences identified have been fused to selectable and reporter genes and introduced in Arabidopsis thaliana plants. Mutants of the transgenic Arabidopsis will be obtained in which the expression patterns conferred by the promoters utilized will be modified. In these manner we will start to*

trolando su expresión. Igualmente, mediante fusión de los promotores estudiados a genes marcadores, hemos procedido a obtener plantas de *Arabidopsis* transgénicas a partir de las cuales estamos seleccionando plantas mutantes en las que se hayan modificado las características de expresión conferidas por dichos promotores. De esta manera nos proponemos determinar la participación de los distintos isoenzimas  $\beta$ -1,3-glucanasas en la reacción de defensa vegetal, y caracterizar aquellos productos vegetales que intervienen en la ruta de transducción que conduce a la inducción de su expresión.

(ii) Con objeto de identificar los factores celulares involucrados en el proceso de muerte celular que ocurre durante la reacción de defensa vegetal, utilizaremos el producto de expresión del gen *hrpN* procedente de la bacteria *Erwinia amylovora*, cuya inoculación en plantas de tabaco provoca, aún en ausencia de cualquier otro factor microbiano, la muerte celular característica de la reacción hipersensible. Utilizando la proteína HRPN purificada, analizaremos mediante *differential display*, los cambios en los niveles de RNAs mensajeros inducidos en la planta en respuesta a su inoculación.

*analyze the plant genes whose encoded products participate in the transduction pathway activated in response to microbial attack.*

*(ii) To identify the cellular factors involved in the formation of necrotic hypersensitive lesions we will examine the changes in gene expression induced in tobacco leaves after infiltration with HRPN, a protein from Erwinia amylovora that induces necrosis in plants even in the absence of any other bacterial product. The gen hrpN from Erwinia amylovora have been cloned by PCR and expressed in E. coli. Changes in expression elicited by the HRPN protein in tobacco cells are been examined by differential display.*

#### **Organismos Financiadores**

##### **Funding Agencies**

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

**Publicaciones / Publications**

- Lummerzheim, M., de Oliveira, D., Castresana, C., Míngues, F.C., Louzada, E., Roby, D., Van Montagu, M. and Timmerman, B.: Identification of compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* L. and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and characterization of the hypersensitive response. *Microbe Interactions* 6, 532-544, 1993.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Alonso, E., de Carvalho Niebel, F., Obregón, P., Gheysen, G., Inzé, D., Van Montagu, M., and Castresana, C.: Castresana; Differential in vitro DNA-binding activity to a promoter element of the gn1  $\beta$ -1,3-glucanase gene in hypersensitive reacting tobacco plants. *The Plant Journal*. (in press, 1995).
- Lummerzheim, M., Sandroni, M., Castresana, C., De Oliveira, D., Van Montagu, M., Roby, D. and Timmerman, B.: *Arabidopsis thaliana* as a model for heavy-metal toxicity: microscopic evidence and enzymatic characterization of the necrosis induced by lead, after foliar spread. *Cell & Environment*. (in press, 1995).

# Entomología. Relación Planta-Insecto

## Entomology. Relationship Plant-Insect

---

**PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ**

Jefe de Grupo  
Group leader

**CARMEN GUTIÉRREZ MARTÍN**

(Hasta III-94)  
Investigadores  
Senior Investigators

**FÉLIX ORTEGO ALONSO (1994)**

Investigador Contratado  
Tenure-track Scientist

**VICENTE MARCO MANCEBÓN (1994)**

B. Postdoctoral  
Postdoctoral Fellow

**ANA MAYORAL CANALEJAS**

**ANA TABERNER PALOP**  
B. Predoctorales  
Graduate Students

**M.ª LUISA RUIZ SERRA**

Personal Técnico  
Technical Staff

---

El objetivo general del grupo es el desarrollo de métodos de control eficaces y respetuosos con el medio ambiente, que prevengan o minimicen las pérdidas causadas por insectos fitófagos, con objeto de ser incorporados a programas de Control Integrado. Parte de nuestra actividad se centra en el estudio de los efectos producidos por determinados compuestos aleloquímicos de bajo y alto peso molecular sobre la biología y el comportamiento de plagas de importancia agrícola. Por otra parte, estamos investigando la biología y ecología del curculiónido *Aubeonymus mariae-franciscae*, plaga de la remolacha azucarera. Específicamente, las líneas de trabajo son:

**Papel de los ácidos hidroxámicos DIMBOA y DIBOA en la resistencia de los cereales a especies de pulgones.**

Se ha puesto a punto un nuevo método de HPLC, rápido y sensible, para la detección y cuantificación de las principales agluconas, DIMBOA y DIBOA, y de la benzoxazolinona MBOA en soluciones acuosas de tejidos de cereales. Dicho método ha permitido realizar un cribado de especies cultivadas y silvestres de cereales. Posteriormente, se ha estudiado la relación entre los niveles de los ácidos hidroxámicos (DIMBOA y DIBOA) en genotipos de trigos blandos y duros y la tasa interna de crecimiento de poblaciones de *Diuraphis noxia*. Por último, se ha evaluado el potencial de la técnica de «Electrical Penetration Graph» en estudios de resistencia, mediante el análisis del comportamiento de alimentación de *D. noxia* en varios genotipos de cereales de invierno, con distintos ni-

*The general aim of the group is the development of efficient and natural methods of preventing or minimizing crop losses caused by phytophagous insects, in order to be incorporated in Integrated Control Programmes. Part of our work is focused on the biological and behavioural effects that allelochemicals of low and high molecular weight might have on the performance of economically important agricultural insect pests. On the other hand, we are studying the biology, ecology and molecular characterization of *Aubeonymus mariae-franciscae*, a pest of sugar beet crops. Specifically, the ongoing research is:*

**Role of hydroxamic acids in protecting cereal crops against aphid damage.** A sensitive HPLC method has been developed for the rapid quantitation of the main aglycones, DIMBOA and DIBOA, and the benzoxazolinone MBOA in aqueous cereal plant extracts. The method has been used in the screening of cultivated and wild Gramineae. Thereafter, the relationship between hydroxamic acids (Hx) (DIMBOA and DIBOA) and the intrinsic rate of natural increase (rm) of *D. noxia* on selected genotypes of bread and hard wheat has been studied. Finally, the potential of the Electrical Penetration Graph technique in insect resistance studies was assessed by determining the feeding behaviour of the Russian wheat aphid (RWA), *Diuraphis noxia*, on cereal genotypes with different Hx levels and on barley, which lacks of these compounds.

veles de DIMBOA, y en cebada que no contiene este compuesto.

**Potencial de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas de insectos en el control de plagas.** Estudios *in vitro* de fracciones monoméricas, diméricas y tetraméricas de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas heterólogas de endosperma de trigo y cebada han mostrado una alta especificidad de inhibición contra  $\alpha$ -amilasas de distintas plagas y efectos negativos en el desarrollo larvario del escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata*, cuando se suministran *in vivo*

**Biología y ecología del curculiónido *Aubeonymus mariae-franciscae* y su caracterización molecular.** Se investigan aquellos aspectos de la biología y ecología de este insecto que son necesarios para el establecimiento de la relación entre el daño debido al ataque del *A. mariae-franciscae* y las pérdidas producidas en el cultivo de la remolacha azucarera. La determinación de esta relación es esencial para el desarrollo de un programa de Control Integrado. Otro aspecto importante es comparar de forma cuantitativa el polimorfismo, a nivel molecular, de poblaciones de *A. mariae-franciscae* mediante la técnica de RAPD, con objeto de determinar la distancia genética entre estas poblaciones.

#### Científicos Invitados / Visiting Scientists

– Dra. Azucena González Coloma (Colaborador). IPON Canarias. (II-1993 a II-1994).

#### Organismos Financiadores / Funding Agencies

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

#### Artículos de Divulgación / Press Articles

- Ayala, J., Domínguez, M., Taberner, A. and Castañera, P.: Biología, ecología y medidas de protección del *Aubeonymus mariae-franciscae*. *AIMCRA*, 41, 38-42, 1994.

**Potential of  $\alpha$ -amylase inhibitors to control agricultural pests.** Studies *in vitro* of the monomeric, dimeric and tetrameric fractions of heterologous  $\alpha$ -amylase inhibitors of wheat and barley endosperm have shown a highly specific inhibitory activity towards  $\alpha$ -amylase of insect pests, and negative effects on the larval performance of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, *in vivo* assays.

**Biology, ecology and molecular characterization of the curculionid, *Aubeonymus mariae-franciscae*, a pest of sugar beet crops.** The biology and ecology of this insect pest are being investigated to establish the pest-damage-loss relationship in sugar beet crops, due to *A. mariae-franciscae*. The assessment of this relationship is an essential step to develop an Integrated Control program. Another important aspect is the quantitative comparisons of the molecular polymorphism among *A. mariae-franciscae* populations by RAPD, in order to assess the genetic distances between them.

**Publicaciones / Publications**

- Gutiérrez, C., García-Casado, G., Sánchez-Monge, R., Gómez, L., Castañera, P. and Salcedo, G.: Three inhibitors types from wheat endosperm are differentially active against  $\alpha$ -amylases of Lepidoptera pests. *Entomol. Exp. Appl.* 66, 47-52, 1993.
- Moriones, E., Ortego, F., Ruiz-Tapiador, M., Gutiérrez, C., Castañera, P. and García-Arenal, F.: Epidemiology of RPV —and PAV— like BYD viruses on winter barley in Central Spain. *Crop Prot.* 12, 224-228, 1993.
- Taberner, A., Castañera, P., Silvestre, E. and Dopazo, J.: Estimation of the intrinsic rate of natural increase and its error by both algebraic and resampling approaches. *Compt. Appl. Biosci.* 9, 535-540, 1993.
- Mayoral, A., Gutiérrez, C., Ruiz, M. L. and Castañera, P.: A high performance liquid chromatography method for quantification of DIBOA, DIMBOA and MBOA from aqueous extracts of corn and winter cereal plants. *J. Liq. Chromatogr.* 17, 2651-2665, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Marco, V. y Castañera, P.: Evaluación en laboratorio de insecticidas contra adultos de *Aubeonymus mariafranciscae* Roudier (Coleoptera, Curculionidae). *Anales INIA «In memoriam Prof. A. Alfaro»*. (en prensa, 1995).

# Genética Molecular de Plantas

## *Molecular Genetics in Plants*

**JAVIER PAZ-ARES RODRÍGUEZ**  
Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**CONCEPCIÓN ÁVILA SAEZ**  
**JUAN VICENTE MONTE HERRÁIZ**  
**CONCEPCIÓN NIETO MAZARRÓN**  
(Hasta VI-1994)

B. Postdoctorales  
*Postdoctoral Fellows*

**ANTONIO FUERTES FISHER**  
**JOAQUÍN IGLESIAS GONZÁLEZ**  
**IGNACIO ROMERO ARANCE**  
**ROBERTO SOLANO TAVIRA**  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**M.<sup>a</sup> JESÚS BENTITO GARCÍA**  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

### **Proyecto 1. Regulación de la Síntesis de Flavonoides. Papel de los Genes *myb***

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios que están implicados en varios caracteres de gran interés biotecnológico, como la coloración de distintas partes de la planta, protección frente a patógenos y radiaciones de luz UV, viabilidad de polen (androesterilidad), etc. La síntesis de los distintos flavonoides incluyen etapas enzimáticas tanto comunes como específicas (ruta ramificada). Mediante experimentos de unión a DNA *in vitro*, inmunolocalización *in situ* y de expresión transitoria en protoplastos, hemos comprobado que la síntesis de estos compuestos podría estar regulada por un grupo de factores transcripcionales relacionados entre sí, las proteínas MYB. En la actualidad tratamos de encontrar mutantes de los genes *myb* en poblaciones de *Arabidopsis thaliana* mutagenizadas por inserción de T-DNA, con objeto de estudiar sus efectos en la síntesis de los flavonoides

### **Proyecto 2. Respuesta de las Plantas a Deficiencias en Fósforo. Bases Genético Moleculares**

El fósforo es uno de los nutrientes más importantes para todos los seres vivos; sin embargo, es muy poco soluble en los suelos. Por ello, las plantas y otros organismos han desarrollado sistemas de respuesta a crecimiento en suelos con baja concentración de fósforo libre. Esta respuesta incluye, entre otros, la inducción de un transportador de fósforo, para mejorar la absorción de este nutriente,

### **Project 1. Regulation of Flavonoid Biosynthesis. Main Role of *myb* Genes.**

*Flavonoid are a group of plant secondary metabolites which are involved in several relevant traits, such as plant coloration, protection against pathogens and UV radiation, pollen viability (androsterility), etc. The synthesis of the different flavonoids involves both common and specific enzymatic steps (branched pathway). Data from DNA-binding studies, protoplast transient expression assays, and in situ immunolocalization experiments, have shown that the synthesis of these compounds might be regulated by a group of related transcription factors, the MYB proteins. At present, we are in the process of screening for mutants at the *myb* loci in T-DNA tagged population of Arabidopsis thaliana plants, so that we can study the effects of these mutations in flavonoid biosynthesis.*

### **Project 2. Molecular Genetics Basis of the Phosphate Starvation Rescue System in Plants**

*Phosphate is one of the most important nutrients for all living creatures; however, it is quite insoluble in soils. To overcome this, plants have evolved systems to respond to growth under low free phosphate in the soil. This rescue system involves enhanced phosphate uptake and induced phosphate scavenging enzymatic activities, such as phosphatases and RNases. We have cloned two genes encoding RNases, and we aim to determine the cis acting sequences responsible of inducibility by this stress. In addition, we*



así como de enzimas mobilizadoras de fosfato (vg., fosfatasas y RNAsas). Hemos clonado genes de RNAsas y pretendemos determinar las regiones de estos genes (*cis*) responsables de su inducción por deficiencias en fosfato e identificar mutantes en la regulación de esta respuesta.

*have started a program to identify mutants in regulatory genes of this rescue system in Arabidopsis thaliana. The ultimate goal of these research lines is to evaluate to what extent one can influence plant polygenic traits by manipulating a small number of regulatory genes.*

El interés último de estas dos líneas de trabajo es evaluar hasta que punto se puede incidir sobre caracteres poligénicos de plantas mediante la manipulación de un número pequeño de genes reguladores.

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CEE, BRIDGE, (1991-1993)
- CEE, BIOTEC, (1993- 1995)
- CICYT, (1991-1993)

#### **Publicaciones / Publications**

- Ávila, J., Nieto, C., Cañas, L., Benito, M.J. and Paz-Ares, J.: *Petunia hybrida* genes related to the maize regulatory C1 gene and to animal *myb* proto-oncogenes. *The Plant Journal* 3, 553-562, 1993.

#### **Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Solano, R., Nieto, C., Ávila, J., Cañas, L., Díaz, I. and Paz-Ares, J.: Dual DNA-binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J.*, (in press, 1995).

# Mecanismos de Resistencia Inducida en Plantas

## *Induced Resistance Mechanisms in Plants*

---

**RAMONA BELTRÁ MARTÍNEZ**

**DE VELASCO** (Jubilada 1-III-1993)

Jefe de Grupo - Investigadora

*Group leader - Senior Investigator*

**M.<sup>a</sup> JOSÉ LÓPEZ LÓPEZ**

B. Predoctoral

*Graduate Student*

---

### **Tesis Doctorales / *Doctoral Thesis***

- M.<sup>a</sup> José López López. Mecanismos de resistencia inducidos por compuestos químicos frente a la podredumbre blanda en tubérculos de patata. Universidad Complutense de Madrid. 1993. Directora: R. Beltrá Martínez de Velasco.

### **Publicaciones / *Publications***

- López López, M.J., López M.M., Marcilla, P., Liébana, E. y Beltrá, R.: Inducción de resistencia en tubérculos de patata frente a podredumbre blanda bacteriana. *Phytoma España* 46, 13-15, 1993.
- López López, M.J., Liébana, E., Marcilla, P. y Beltrá, R.: Resistance induced in potato tubers by treatment with acetylsalicylic acid to soft rot produced by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Phytopathology*, 1994.

# Organización Nuclear Durante el Desarrollo de Plantas

## *Nuclear Organization During Plant Development*

**M.<sup>a</sup> CARMEN RISUEÑO ALMEIDA**

Jefe de Grupo - Investigadora  
*Group leader - Senior Investigator*

**BEGOÑA FADÓN SALAZAR**

Investigadora Asociada  
*Associate Scientist*

**PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO**

Investigadora Contratada  
*Tenure-track Scientist*

**CONCEPCIÓN GÓMEZ MENA**

**PABLO GONZÁLEZ-MELENDI**

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**CARLOS ALMARZA SANZ**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

**1. Estudio de las bases celulares del proceso de inducción de androgénesis: desarrollo de embriones haploides a partir de granos de polen cultivados *in vitro*, para su aplicación en la mejora vegetal:**

a) Optimización del cultivo *in vitro* de anteras y granos de polen aislados para obtención de embriones haploides en plantas de interés agrícola y plantas modelo.

b) Determinación de marcadores celulares del proceso de inducción de androgénesis, mediante comparación de los patrones de desarrollo gametofítico y esporofítico. Caracterización del estadio de desarrollo más adecuado para la inducción.

c) Estudio de la evolución de las estructuras subcelulares, en especial del núcleo celular, durante las primeras fases de la androgénesis. Determinación de los principales cambios ultraestructurales en relación a la actividad celular, cambios en el patrón de condensación cromatínica, localización de antígenos nucleares, transcritos y genes específicos implicados en la inducción (proteínas *heat-shock*, factores reguladores de ciclo celular como *cdc2*, PCNA y algunas quinasas).

**2. Estudio de la organización supramolecular del núcleo en células vegetales en proliferación y durante procesos de desarrollo *in vivo* e *in vitro* como la formación del polen y la androgénesis:**

a) Caracterización de los distintos compartimentos funcionales del núcleo: nu-

**1. Study of the cellular bases dealing with the induction of the androgenesis: development of the haploid embryos from pollen grains cultured *in vitro*, for their subsequent application in plant breeding:**

a) Optimization of the *in vitro* culture of anthers and isolated pollen grains for obtaining haploid embryos in plants of agricultural interest and also in model plants.

b) Determination of cellular markers in the induction of the androgenetic process by comparison of the patterns of the gametophytic and sporophytic patterns of development. Characterization of the most susceptible developmental stage for the androgenesis induction.

c) Study of the evolution of the subcellular structures, specially the cell nucleus, during the first stages of the androgenesis. Determination of the main ultrastructural modifications in relation to the nuclear activity: changes in chromatin condensation, localization of nuclear antigens, transcripts and specific genes involved in the induction process (*heat-shock* proteins, regulating factors of the cell cycle, as *cdc2*, PCNA and some kinases).

**2. Study of the supramolecular organization of the nucleus in plant cells in proliferation and during developmental processes *in vivo* and *in vitro*, like pollen formation and androgenesis:**

a) Characterization of the functional compartments of the cell nucleus:

cleolo, cromatina y región intercromatínica en relación a los cambios en la actividad nuclear. Localización de macromoléculas reguladoras en los mismos mediante el empleo de sondas moleculares para inmunocitoquímica e hibridación *in situ*.

**b)** Mapeo ultraestructural de lugares de transcripción y replicación, nucleolar y extranucleolar, mediante el desarrollo de potentes técnicas *in situ* (como el inmunomarcado con anti-híbridos DNA/RNA, anti-PCNA y otros factores, incorporación *in vivo* de BrUTP y BrdU). Determinación de estructuras nucleares involucradas en estos procesos y sus variaciones en distintas fases del ciclo celular y durante los procesos de desarrollo mencionados.

**c)** Estudio de la arquitectura nucleolar en relación a la transcripción ribosómica en células vegetales y animales con distintos grados de actividad. Localización de factores implicados en las diversas etapas de transcripción y procesamiento (como la RNA pol I, el UBF, los snoRNAs, la fibrilarina, etc) y diferentes especies de genes y transcritos ribosómicos (45S, 18S, 25S, espaciadores transcritos y no transcritos) en los distintos componentes nucleolares.

La metodología empleada para estos estudios se basa en los modernos métodos de microscopía electrónica, así como de la confocal, incluyendo inmunomarcados con oro coloidal, fluorescencia y amplificación con plata, hibridación *in situ* con sondas no radioactivas reveladas por partículas de oro o fluorocromos, y las modernas inmunocitoquímicas moleculares para localizar distintas regiones funcionales del DNA, como la

*nucleolus, chromatin and interchromatin region, in relation to changes in nuclear activity. Localization of regulatory macromolecules in these nuclear compartments by using molecular probes for immunocytochemistry and in situ hybridization.*

*b) Ultrastructural mapping of transcription and replication sites, nucleolar and extranucleolar, by the development of powerful in situ methods, (like the immunolabelling with anti DNA/RNA hybrids, anti-PCNA, and other factors, in vivo incorporation of BrUTP and BrdU). Determination of the nuclear structures involved in these processes and their variations at different cell cycle periods and during the developmental processes above mentioned.*

*c) Study of the nucleolar architecture in relation to ribosomal transcription in plant and animal cells with different activity degrees. Localization of factors involved in the different steps of transcription and processing (like RNA pol I, UBF, snoRNAs, fibrillarlin, etc) and different species of ribosomal genes and transcripts (45S, 18S, 25S, transcribed and non-transcribed spacers) on the various nucleolar components.*

*The methodology used for these studies is based on the modern electron and confocal microscopy, including immunolabelling with colloidal gold, fluorescence and silver enhancement, in situ hybridization with non-isotopic probes developed by gold particles or fluorochromes, and the modern molecular immunocytochemical methods for localizing different functional regions of DNA (like the in situ TdT reaction, the BrdU method and the in situ nick translation). These techniques are combined with ultras-*

reacción de la TdT *in situ*, el método de la BrdU o la nick translation *in situ*. Todas estas técnicas se combinan con citotómicas ultraestructurales para DNA, RNA y proteínas que mejoran la visualización de las estructuras nucleares y la correcta asignación del marcado.

3. Diseño y desarrollo de métodos de procesamiento de muestras en frío para la preservación de la reactividad química y antigénica celular, así como de la estructura más cercana al estado *in vivo*, todo ello indispensable para una correcta aplicación de las modernas técnicas de localización *in situ* anteriormente descritas. Entre estos criométodos se incluyen la criofijación, criosustitución, crioultramicrotomía e inclusión en resinas a baja temperatura y la adaptación y aplicación de las mismas al difícil material vegetal.

4. Estudio de la acción de las poliaminas durante la embriogénesis del polen y el proceso de senescencia inducido por choque osmótico. Inmunolocalización ultraestructural de distintos elementos tilacoidales en hojas senescentes y protegidas con poliaminas.

*structural cytochemical methods for DNA, RNA and proteins which improve the visualization of nuclear structures and the right assignemet of the labelling.*

3. *Design and development of methods for cryoprocessing of samples to preserve the chemical and antigenic reactivity of the cell, as well as the structure nearest to the in vivo state, as a neccessary requirement for a correct application of the in situ techniques described above. Among these cryomethods, the cryofixation, cryosubstitution, cryoultramicrotomy and embedding in resins at low temperature are considered, as well as the adaptation and application of them to plant material.*

4. *Study of the action of polyamines during pollen embryogenesis and in the process of senescence induced by osmotic shock. Immunoelectron microscopy detection of different tilacoidal elements in both senescent and polyamine-protected leaves.*

#### **Tesis Doctorales / Doctoral Thesis**

- Begoña Fadón Salazar. Estudio ultraestructural y detección *in situ* de macromoléculas durante el desarrollo del polen de *Capsicum annuum* L. en relación con el proceso de inducción de la androgénesis *in vitro*. Universidad Autónoma de Madrid, 1993. Directora: M.C. Risueño.

**Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Dr. D.L. Spector, Senior Staff Researcher. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, U.S.A. (VI-1993).
- Dr. O. Vicente, Assistant Professor. Institut für Mikrobiologie und Genetik, Biozentrum Dr. Bohr-Gasse, Universidad de Viena, Austria. (X-1993 y XI-1994).
- Dr. K. Koberna, Post-doctoral fellow. Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Praga, República Checa. (II-1994).
- Dr. P. Ahmadian, Full Professor, Department of Plant Breeding, Agricultural University of Tehran, Iran. Año Sabático, M.E.C., (desde IV-1994).
- Dr. J. Reyes, Investigador del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba. (Seis meses con beca del I.C.I. X-1993 a IV-1994).

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PB88-0332-C02-01 (1988-1993)
- DGICYT, PB92-0079-C03 (1993-1996)
- DGICYT, PB92-0079-C03-01 (1993-1996)
- Proyecto de Cooperación Hispano-Austriaco: CSIC/Universidad de Viena (1993-1994)
- Proyecto de Cooperación Hispano-Checo: CSIC/Academia Checa de Ciencias (1993-1994)
- Acción Integrada Hispano-Británica: Univ. Barcelona/CSIC/AFRC, Inst. Horticultural Research, U.K. (1990-1993)

**Publicaciones / Publications**

- Olmedilla, A., Risueño, M.C.: Localización de ácidos nucleicos mediante hibridación *in situ*. En: "Progresos en Biología Celular". (Eds.) Becerra, J., Pérez-Figares, J.M., Fernández-Llóbreg, P. Univ. Málaga, págs. 147-150, 1993.
- Olmedilla, A., Testillano, P.S., Vicente, O., Delseny, M. and Risueño, M.C.: Ultrastructural rRNA localization in plant cell nucleoli: RNA/RNA *in situ* hybridization, autoradiography and cytochemistry. *J. Cell Sci.* 106, 1333-1346, 1993.
- Risueño, M.C., Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., Ollacarizqueta, M.A. and Tandler, C.J.: The NAMA-Ur: a specific method to stain DNA at T.E.M. In: "Procedures on Electron Microscopy". (Eds.) Robards, A.W. and Wilson, A.J. Chapter 5, Wiley, Sussex, England., pp. 5:6.23-5:6.26, 1993.
- Risueño, M.C.: Aspectos estructurales y funcionales del nucléolo. En: "Progresos en Biología Celular". (Eds.) Becerra, J., Pérez-Figares, J.M., Fernández-Llóbreg, P. Univ. Málaga, págs. 129-134, 1993.
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Fadón, B., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A. and Risueño, M.C.: Immunolocalization of nuclear antigens and ultrastructural cytochemistry on tapetal cells of *Scilla peruviana* and *Capsicum annum*. *Pl. Syst. Evol.* [Suppl. 7], 75-90, 1993.
- Testillano, P.S., Sánchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., Fuchs, J.P. and Risueño, M.C.: Characterization of the interchromatin region as the nuclear domain containing snRNPs in plant cells: a cytochemical and immunoelectron microscopy study. *Eur. J. Cell Biol.* 61, 349-361, 1993.
- Lafarga, L., Berciano, M.T., Andrés, M.A. and Testillano, P.S.: Protein synthesis inhibition induces structural changes in nucleoli and nuclear coiled bodies of normal and stimulated supraoptic neurons of the rat. *J. Neurocytol.* 23, 500-513, 1994.

- Mena, C.G., Testillano, P.S., González-Melendi, P., Gorab, E. and Risueño, M.C.: Immunoelectron microscopy of RNA combined with nucleic acid cytochemistry in plant nucleoli. *Exp. Cell Res.* 212, 393-408, 1994.
- Pardo, C., Cubas P. and Testillano, P.S.: Tendances evolutives de la structure exinique chez *Ulex*, *Stauracanthus* et *Genista* (*Genistae*, *Papilionoideae*, *Leguminosae*). *Acta bot. Gallica* 141, 195-205, 1994.
- Reyes, J., Testillano, P.S. and Risueño, M.C.: The BrdU immunogold labelling to localize replicated DNA in plant cell nuclei. In: "Electron Microscopy 1994", (Eds.) Jouffrey, B and Colliex, Vol 3A. Les Editions de Physique, Paris, pp. 487-488, 1994.
- Risueño, M.C. and Testillano, P.S.: Cytochemistry and immunocytochemistry of nucleolar chromatin in plants, a review. *Micron* 25, 331-360, 1994.
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Reyes, J., Koberna, K., Mena, C.G. and Risueño, M.C.: The MA method used as nucleic acid cytochemistry for immunogold studies of plant and animal cell nuclei. In: "Electron Microscopy 1994", (Eds.) Jouffrey, B. and Colliex, Vol. 3A. Les Editions de Physique, Paris, pp. 451-452, 1994.
- Testillano, P.S., Gorab, E. and Risueño M.C.: A new approach to map transcription sites at the ultrastructural level. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1-10, 1994.
- Tiburcio, A.F., Besford, R.T., Capell, T., Borrel, A., Testillano, P.S. and Risueño, M.C.: Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. *J. Exp. Bot.* 45, 1789-1800, 1994.

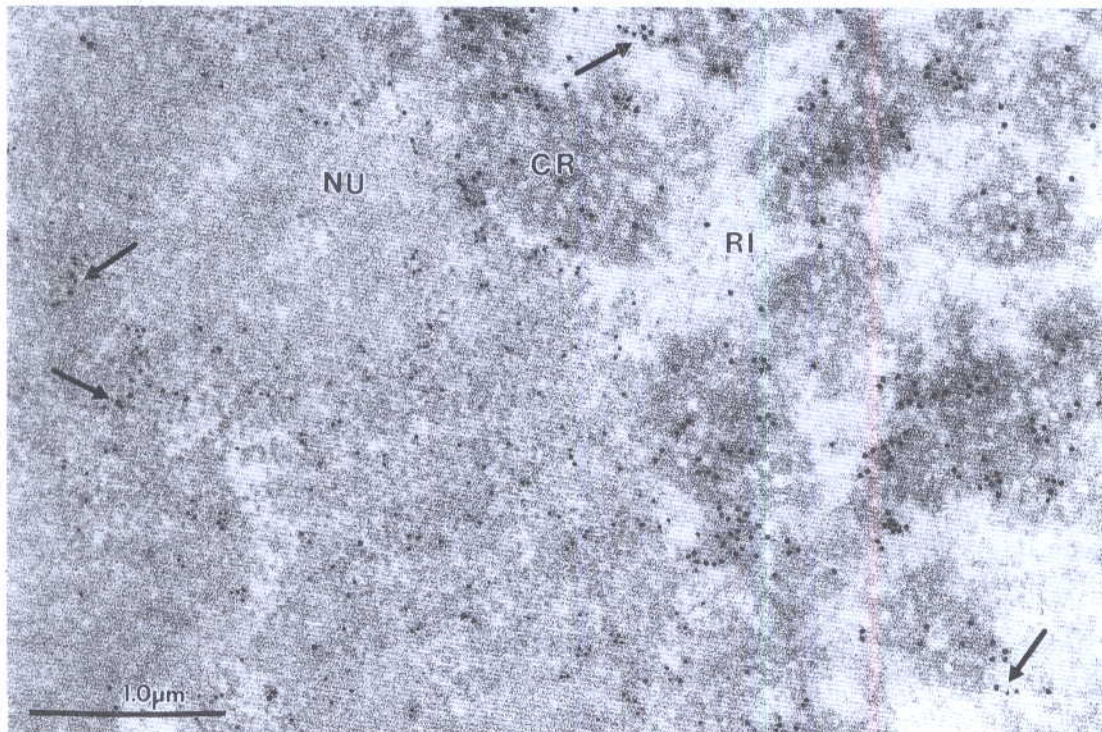


Figura: Colocalización de DNA y RNA en estructuras nucleares de una célula meristémica de raíz de cebolla (*Allium cepa* L.) mediante doble inmunomarcado con oro. Las partículas grandes localizan DNA y las pequeñas RNA; las flechas marcan lugares de colocalización. Nucléolo, NU; cromatina condensada, CR; región intercromatínica, RI. (M.C. Risueño et al., 1994).

Figure: Colocalization of DNA and RNA in nuclear structures of a meristematic cell of onion root (*Allium cepa* L.) by double immunolabelling with gold. Large particles localize DNA and small particles RNA. The arrows indicate places of colocalization. Nucleolus, NU; condensed chromatin, CR; interchromatin region RI. (M.C. Risueño et al., 1994).

# Quimiorrecepción en Insectos

## *Chemical Communication in Insects*

**ELÍAS MANUEL ROBLES CHILLIDA**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**ISABEL MAYO GUERRA**

Investigadora Asociada

*Associate Scientist*

### **Comunicación química en insectos de interés económico: Morfología funcional, relación huésped-parásito e incidencia de pesticidas**

Los equipos receptores existentes en los insectos, ejercen un papel fundamental en su desarrollo y supervivencia, y de aquí la importancia de su esclarecimiento. Conocido éste, cualquier acción encaminada a provocar la disfunción de este equipo receptor, puede ser del máximo interés en la lucha contra las plagas de insectos de interés económico.

Con respecto a la relación huésped-parásito, hemos llevado a cabo estudios de quimiorrecepción en hospedador vegetal-parásito (*Rosacea prunoidea-Capnodis tenebrionis*) y en hospedador animal-parásito (*Aleurothrixus floccosus-Cales noacki*).

Es de destacar la modificación del equipo quimiorreceptor de *Capnodis tenebrionis*, en función del cambio de hábitat que experimenta el primer estadio larvario, cuando penetra en la planta hospedadora, de forma que disminuye la quimiorrecepción a distancia (olfativa) y aumenta la quimiorrecepción de contacto (gustativa) a lo largo del desarrollo larvario. Sin embargo, en el equipo mecanorreceptor no se han observado notables alteraciones entre el primer y último estadios larvarios.

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

*The receptor system of insects play an essential role in their development and survival, and so the importance of their clarification. Once known, any action designed to make a disturbance of this receptor system, could be of great interest in the pest control of economic importance.*

*With regard to host-parasite relation, we have carried out several studies of chemoreception about host plant-parasite (Rosacea prunoidea- Capnodis tenebrionis) and host animal-parasite (Aleurothrixus floccosus- Cales noacki).*

*It is very interesting the modification of chemoreceptor system of Capnodis tenebrionis according to change of habitat of first instar larval when it penetrates into the host plant, in such a way that decrease the olfactory function and increase the taste reception along larval development. However, at the mechanoreceptor system we have not observed remarkable alterations between first and last larval instars.*



**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, 816 (1991-1993)

**Publicaciones / Publications**

- Mayo, I., Beitia, F., Garrido, A. y Robles-Chillida, E.M.: Un estudio del sistema receptor antenal de las hembras de *Caless noacki* (How.) (*Hymenoptera: Aphelinidae*), a microscopía electrónica de barrido. *Phytoma* 48, 22-30, 1993.

# Virología Molecular de Plantas

## Plant Molecular Virology

**JOSÉ RAMÓN DÍAZ RUÍZ** (Lab. 1)  
Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**CARMEN FERREIRO ESTEBAN** (1993)  
**LEANDRO PEÑA GARCÍA**  
(Hasta VII-1993)  
**ESTEBAN SAN JOSÉ MÉNDEZ** (1994)  
B. Postdoctorales  
*Postdoctoral Fellows*

**M.<sup>a</sup> CARMEN LAHOZ BELTRÁ** (1994)  
**FRANCISCO TENLLADO PERALO**  
**JUMANA TRAD YUNES** (1993)  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**ISABEL GARCÍA LUQUE** (Lab. 2)  
Jefe de Grupo  
*Group leader*

**M.<sup>a</sup> TERESA SERRA YOLDI**  
Investigadoras  
*Senior Investigators*

**M.<sup>a</sup> ÁNGELES CEREZUELA ROSIQUE**  
Investigadora Asociada  
*Associate Scientist*

**ALFREDO BERZAL HERRANZ** (1993)  
B. Postdoctoral  
*Postdoctoral Fellow*

**ALBERTO DE LA CRUZ**  
**BENJAMÍN BERDIALES FRAGA** (1994)  
**PATRICIA GILARDI NAVARRO**  
(Desde VI-1994)

**ANA ISABEL SANZ MOLINERO**  
**JOSÉ M.<sup>a</sup> TOSTADO ALVAREZ**  
**CARMEN VAQUERO MARTÍN**  
B. Predoctorales  
*Graduate students*

### (Lab. 1)

Nuestra línea de trabajo está orientada hacia el control biológico de enfermedades virales en plantas de importancia económica para la agricultura española, mediante (i): la caracterización de nuevos virus de interés agrícola (ii): el estudio de la biología de RNAs satélites y RNAs defectivos interferentes de virus de plantas y su función reguladora de expresión viral (iii): el análisis de estrategias de resistencia transgénica a virus en plantas.

### (Lab. 2)

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

En nuestro laboratorio llevamos a cabo el análisis de los mecanismos de resistencia vegetal que operan en el género *Capsicum* frente a los tobamovirus mediante i: la caracterización biológica y molecular de las diferentes cepas pimiento de los tobamovirus; ii: la identificación de los factores virales responsables de la inducción de la respuesta de defensa; e iii: el estudio de los mecanismos de acción de los genes de resistencia, cuyas bases moleculares son hoy en día desconocidas

### (Lab. 1)

*Our research line is focused toward the biological control of economically important plant virus diseases for the spanish agriculture through (i): the characterization of new, agriculturally interesting viruses (ii): the study of the biology of plant virus satellites and defective interfering RNAs and their regulatory role in viral expression (iii): the analysis of transgenic resistance strategies to viruses in plants.*

### (Lab. 2)

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

*In our lab, we have initiated the analysis of the resistance mechanisms that operate in the the genera *Capsicum* against the tobamoviruses through i: the biological and molecular characterization of the pepper strains of the tobamoviruses; ii: the identification of viral factors involved in the elicitation of the host response; and iii: the study of the mechanism of action of the L resistance gene, being their molecular basis at present unknown.*

**DIONISIO LÓPEZ ABELLA** (Lab. 3)  
 Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**TOMÁS CANTO CEBALLOS**

**JUAN JOSÉ LÓPEZ MOYA**

B. Postdoctorales  
*Postdoctoral Fellows*

(Labs. 1, 2 y 3)

**EMILIANA LIÉBANA ALLENDE**

(Desde III-1994)

**MONSERRAT LLORENTE DE MINGO**

**ADELA MARTÍN DE SAAVEDRA**

**SACRAMENTO PEÑALVER ESPINO**

(Hasta VI-1994)

Personal Técnico

*Technical Staff*

Hemos podido determinar mediante la construcción de transcritos virales quiméricos que las proteínas de cubierta de las cepas de los tobamovirus que quedan localizadas por acción de los productos de dos de estos genes de resistencia denominados  $L^2$  y  $L^3$  son los factores virales responsables de la activación de la respuesta de defensa.

Asimismo, hemos establecido, que a diferencia de los genes de resistencia frente a virus, que provocan una reacción hipersensible, la acción del gen  $L^3$  resulta no sólo en la localización de la infección sino también en la supresión de la replicación viral.

En la caracterización de la respuesta de defensa del huésped, hemos identificado una serie de proteínas pertenecientes al grupo de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PRs), algunas de las cuales las estamos utilizando como marcadores de la resistencia activa en pimiento.

La dilucidación de los mecanismos básicos del movimiento de célula-a-célula de los virus de las plantas se ha abordado utilizando como virus modelo de estudio el virus del mosaico del pepino (CMV), puesto que es de todos los virus de plantas conocidos, el que posee un mayor rango de huéspedes, siendo capaz de infectar más de 700 especies vegetales diferentes en todas las regiones del planeta. Este hecho indica que CMV, y en contraposición a la mayoría de los virus de las plantas, puede realizar la función de movimiento en huéspedes muy distanciados entre sí.

Los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio hasta el momento nos han

*By constructing chimeric hybrid viruses at the cDNA level, we have identified the viral coat proteins of those viruses sensitive to the action of the  $L^2$  and  $L^3$  resistance genes as the viral elicitors of the host defense reaction.*

*We have also established that the  $L^3$  gene mediated-activity results not only in the induction of the hypersensitive reaction but in the suppression of viral replication. This fact constitutes a hallmark for the  $L^3$  gene mediated-resistance, in contrast to the action of the plant virus resistance genes known at present that only lead to the localization of the viral infection.*

*In the characterization of the host defense response, we have identified distinct proteins, members of the pathogenesis related proteins (PRs) group. We are using some of them as markers in our current analysis of the pepper active defense reaction.*

*To elucidate the basic mechanisms underlying the plant viruses cell-to-cell movement we have chosen as a plant-virus model system CMV, since it is the plant virus with the widest host range, being able to infect over 700 different plant species all over the world. This fact is indicative that in contrast to most of the plant viruses is able to exert the movement function in distantly-related hosts.*

*The work carried out in our lab has allowed us to identify the non-structural 3a protein as the viral factor responsible for the cell-to-cell movement of the virus. We are currently analyzing the effect of the*

permitido identificar inambiguamente a una de las proteínas no estructurales del virus, la proteína 3a, como el factor viral responsable de la función de movimiento. Actualmente estamos analizando el efecto que tiene la expresión constitutiva en las plantas de RNAs antisense así como formas mutadas de dicha proteína sobre el movimiento y la replicación viral.

### (Lab. 3)

La necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control de enfermedades virales de importancia económica para la agricultura española, nos lleva a las siguientes líneas de trabajo:

- Estudio de la funcionalidad de las proteínas que participan en la transmisión por áfidos de algunos virus de plantas (PPV, PVY).
- Análisis molecular de la proteína factor de transmisión "helper" (HC-Pro).
- Evaluación de métodos de detección y producción de anticuerpos monoclonales de PPV y HC-Pro.

### Tesis Doctorales / Doctoral Thesis

- Juan José López Moya. Estudio de la transmisión por áfidos del virus de la sarka, *plum pox virus* (PPV). Universidad Politécnica de Madrid, 1993. Director: D. López Abella.
- Tomás Canto Ceballos. Mecanismos de transmisión de virus del grupo potyvirus por áfidos: estudio del factor de adquisición "Helper". Universidad Complutense de Madrid, 1994. Director: D. López Abella.
- Carmen Vaquero Martín. Caracterización de la proteína 3a del virus del mosaico del pepino. Universidad Autónoma de Madrid, 1994. Directora: I. García Luque.

### Científicos Invitados / Visiting Scientists

- Dr. K. Ostrowska. Instituto de Genética de Plantas. Academia de Ciencias de Polonia. (1993). (Lab. 1)
- Dr. Ramón Peñalver Navarro. IVIA, Moncada, Valencia. (V-1993). (Lab. 2)
- Dña. Lissett López Morejón. CIGB. La Habana. Cuba. (1994). (Lab. 2)
- Prof. Dr. R. Gaborjanyi. Plant Protection Institute. Hungarian Academy of Sciences. (VI-1994). (Lab. 1 y 3)

*constitutive expression of the 3a antisense RNA as well as mutated forms of the movement protein upon the viral spread and accumulation.*

### (Lab. 3)

*The need for developing new strategies of control for viral diseases of economical importance for Spanish Agriculture, takes us to design our current research oriented to:*

- *Studies to the functionality of proteins involved in the transmission process by aphids of PPV and PVY.*
- *Molecular analysis of the helper component protein (HC-Pro).*
- *Evaluation of methods in detection and production of several PPV and HC-Pro monoclonal antibodies.*

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CICYT, AGR91-0432 (1991-1994)
- CEE, BIOT-CT90-0156 (SMA) (1991-1994)
- CDTI-Empresa WESTERN SEED ESPAÑA SA. Proyecto Concertado 92104 (1992-1993)
- CICYT, AGF94-0364 (1994-1995)
- INIA, SC93-184-C5-5 (1993-1996)
- Cooperación Científica-Técnica España-Hungría (1992-1994)

**Artículos de Divulgación / Press Articles**

- Páez Abril, E., Domingo Solans, E., Díaz Ruiz, J.R. y Fernández Muñoz, R. : El Resurgir de los Virus. Diario EL PAIS. En: Futuro. Suplemento de Ciencia Técnica e Informática. Año V, n.º 148, Segunda Epoca, pp. 1-5, 10 de Febrero de 1993.
- Sanz, A., Vaquero, C. y García-Luque, I.: Comentarios a la Bibliografía Internacional. Publicación Oficial Soc. Españ. Virología 1, 43-45, 1993.

**Publicaciones / Publications**

- García-Luque, I., Ferrero, M.L., Rodríguez, J.M., Alonso, E., de la Cruz, A., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T. and Díaz-Ruiz, J.R.: The nucleotide sequence of the coat protein genes and 3' non-coding region of two resistance-breaking tobamoviruses in pepper shows that they are different viruses. *Arch. Virol.* 131, 75-88, 1993.
- Tostado, J.M., Castresana, C., García-Luque, I., Díaz-Ruiz, J.R. and Serra, M.T.: Enzymatic characterization of  $\beta$ -1-3-glucanases and chitinases induced by TMV and PMMV-S in pepper plants. In: *Mechanisms of plant defense responses*. B. Fritig and M. Legrand (Eds.). Kluwer Academic Publishers, pp. 387, 1993
- Wu G., Kaper, J.M., Tousignant, M.E., Masuta, C., Kuwata, S., Takanami, Y., Peña, L. and Díaz-Ruiz, J.R.: Tomato necrosis and the 369-nucleotide Y-satellite of Cucumber mosaic virus: Factors affecting satellite biological expression. *J. Gen. Virol.* 74, 161-168, 1993.
- Díaz-Ruiz, J.R. y García Jiménez J. (Editores). Enfermedades de las Cucurbitáceas en España. *SEF-Phytoma*, Agropubli S.L. Valencia. 155 pp., 1994.
- Díaz-Ruiz, J.R. y García Jiménez J.: Enfermedades y patógenos de las cucurbitáceas. En: *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. J.R. Díaz-Ruiz y J. García Jiménez (Eds.). *SEF-Phytoma*, Agropubli S.L. Valencia pp. 19-23, 1994.
- Gera, A., Tostado, J.M., García-Luque, I. and Serra, M.T.: Association of the inhibitor of virus replication with resistance mechanisms in pepper cultivars. *Phytoparasitica* 22, 219-227, 1994.
- López-Moya, J.J., Canto, T., López-Abella, D. and Díaz-Ruiz, J.R.: Differentiation of mediterranean plum pox virus isolates by coat protein analysis. *Plant Pathol.* 43, 164-171, 1994.
- López-Moya, J.J., Sanz, A., Cambra, M., Gorris, M.T., Anaya, C., Miguét, J.G., Cortés, E. and López-Abella, D.: Production and characterization of monoclonal antibodies to plum pox virus and their use in differentiation of Mediterranean isolates. *Arch. Virol.* 135, 2933-2934, 1994.
- Peña, L., Trad, J., Díaz-Ruiz, J.R., McGarvey, P.B. and Kaper, J.M.: Cucumber mosaic virus protection in transgenic tobacco plants expressing monomeric, dimeric or partial sequences of a benign satellite RNA. *Plant Science* 100, 71-81, 1994.

- Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T. and Díaz-Ruiz, J.R.: Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting L-resistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis. *J. Virological Methods*. 47, 165-174, 1994.
- Vaquero, C., Turner, A., Demangeat, G., Sanz, A., Serra, M.T., Roberts, K. and García-Luque, I.: The 3a protein from cucumber mosaic virus increases the gating capacity of plasmodesmata in transgenic tobacco plants. *J. Gen. Virol.* 75, 3193-3197, 1994.
- Wu, G., Tousignant, M.E., Kaper, J.M., Masuta, C., Kuwata, S., Takanami, Y., Peña, L. and Díaz-Ruiz, J.R.: Role of helper virus and environmental conditions on the tomato necrosis induced by cucumber mosaic virus associated satellite RNAs. In: *Virology in the Tropics*. N. Rishi, K.L. Ahuja and B.P. Singh (Eds.) Malhotra Publishing House, New Delhi pp. 133-140, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- López Abella, D., Díaz Múgica, M.V., Díaz Ruiz, J.R., Moreno, R. y Rubio Huertos, M.: Detección y caracterización mediante microscopía electrónica de diferentes rhabdovirus vegetales. *Anales INIA. Serie Agrícola*, 1994.

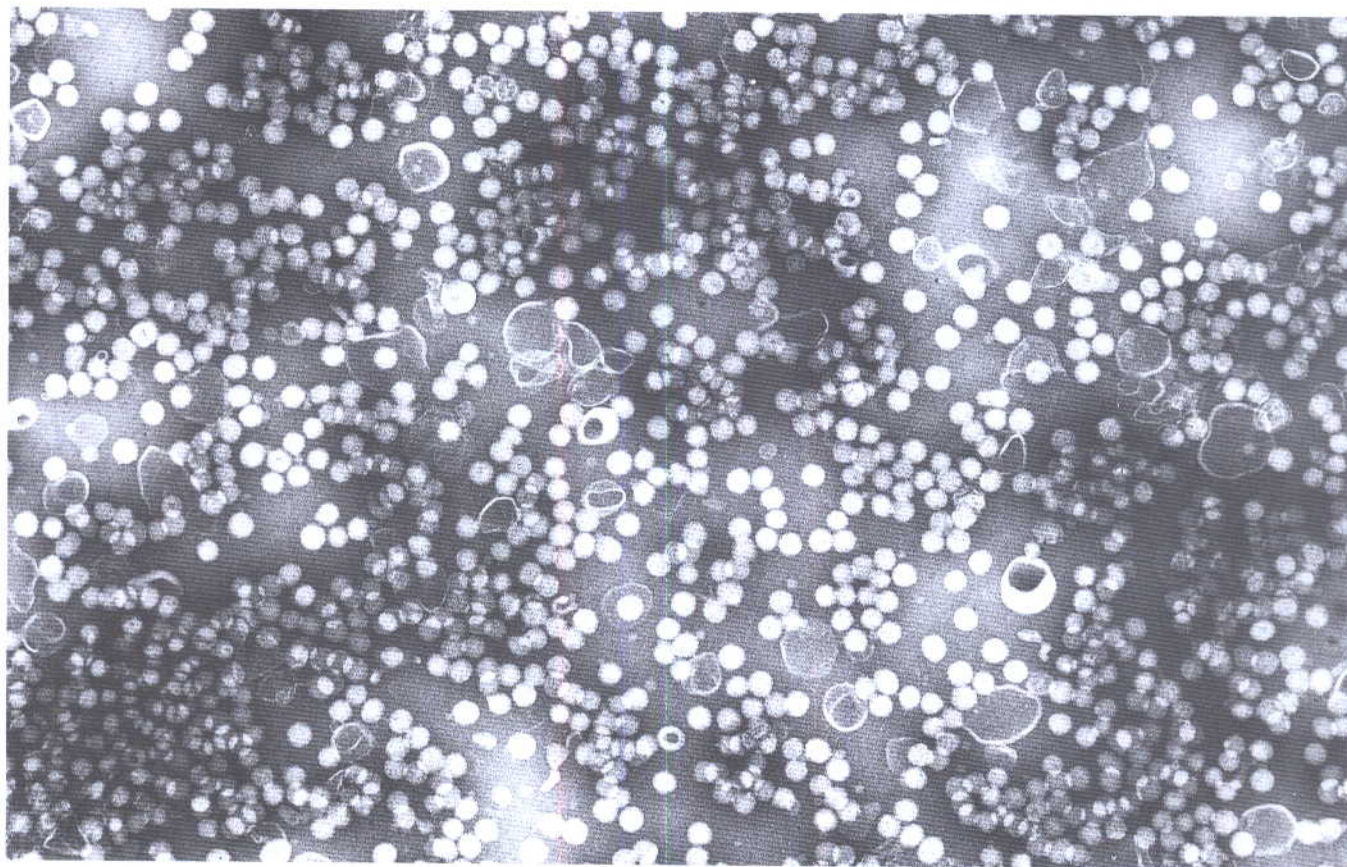
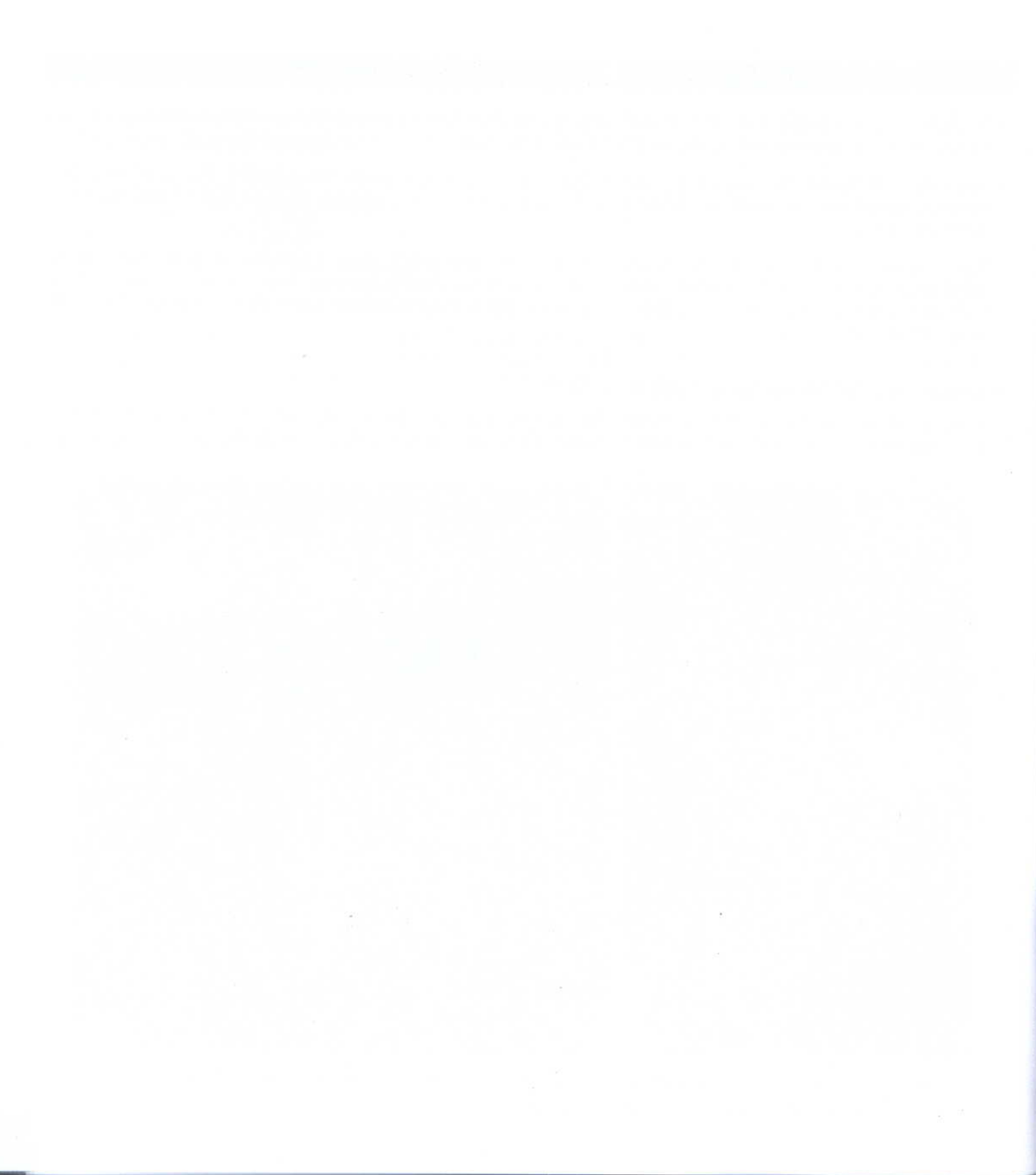


Figura: Micrografía electrónica de las partículas purificadas del virus de las manchas bronceadas del tomate.

Figure: Electron micrograph of purified tomato spotted wilt virus particles.



**DEPARTAMENTO DE ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS**  
**DEPARTMENT OF PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION**

Jefe de Departamento <i>Department Head</i>	<b>JUAN MANUEL RAMÍREZ DE VERGER LOBO</b>
Investigadores / <i>Scientists</i> Profesores de Investigación:	<b>J. MANUEL ANDREU MORALES</b> <b>PEDRO J. APARICIO ALONSO</b> <b>MANUEL ESPINOSA PADRÓN</b> <b>GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO</b> <b>VICENTE LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA</b> <b>JUAN M. RAMÍREZ DE VERGER LOBO</b>
Investigadores Científicos:	<b>PALOMA LÓPEZ GARCÍA</b> <b>M.<sup>a</sup> TERESA PÉREZ DE UREÑA</b>
Colaboradores Científicos:	<b>SANTIAGO LAMAS</b> <b>ALBERTO MARQUET ESPINOSA</b> <b>EDUARDO RIAL ZUECO</b> <b>LUIS RIVAS LÓPEZ</b>
Secretaria:	<b>M.<sup>a</sup> DEL CARMEN PARTEARROYO LACABA</b>



# Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores

## Mitochondrial Bioenergetics: Uncoupling Mechanisms

**EDUARDO RIAL ZUECO**

Jefe de Grupo - Investigador  
Group leader - Senior Investigator

**IGNACIO ARECHAGA ITURREGUI**

**M.<sup>a</sup> DEL MAR GONZÁLEZ BARROSO**

**SUSANA PRIETO ARAMBURU**

B. Predoctorales  
Graduate Students

**PILAR ZARAGOZA JIMÉNEZ**

Personal Técnico  
Technical Staff

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

En las mitocondrias del tejido adiposo pardo la proteína desacoplante (UCP) permite la re-entrada de los protones a la matriz disipando, por tanto, el gradiente de potencial electroquímico. Este proceso termogénico es de gran importancia en mamíferos recién nacidos y en la adaptación al frío. Nuestro trabajo se centra en el estudio mediante mutagénesis dirigida de las relaciones estructura-función en la UCP expresada en levaduras. El objetivo es descifrar el mecanismo de transporte y de regulación de la actividad.

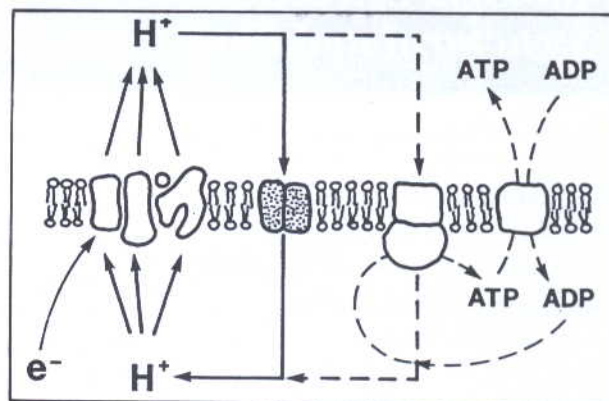
Nuestro grupo ha descrito la existencia de un mecanismo que permite disminuir la eficiencia de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Este mecanismo desacoplador se activa cuando se alcanza unos niveles altos de ATP citosólico y es inhibido por ADP y fosfato. El sistema tiene dos componentes: uno modula la actividad de la citocromo *c* oxidasa mientras que el otro permite el paso de iones. La finalidad de esta vía podría ser la de per-

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

*Brown fat mitochondria possesses an uncoupling protein (UCP) which catalyzes proton reentry into the matrix thus dissipating its electrochemical potential gradient. This thermogenic process is important in newborn mammals and during cold-adaptation. Our research concentrates on the analysis, by site-directed mutagenesis, of the structure-function relationships in UCP expressed in yeasts. Our aim is to unravel the transport mechanism and the regulation of UCP activity.*

*We have recently described a mechanism that controls the phosphorylation efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. This uncoupling mechanism is activated by high cytosolic ATP levels and inhibited by ADP and phosphate. The system has two components: one modulates the activity of cytochrome *c* oxidase and the other facilitates ion permeation. The purpose of this uncoupling pathway would be to allow rapid oxidation of the excess NAD(P)H produced when yeasts are grown under aerobic conditions with a single carbon source. Our group is trying to identify the proteins involved and investigates the uncoupling mechanism and its regulation.*

mitir la rápida oxidación del exceso de NAD(P)H que se produce cuando las levaduras crecen en aerobiosis con una fuente de carbono única. Nuestro objetivo es identificar las proteínas responsables de estas actividades y descifrar el mecanismo desacoplador y su regulación.



### Tesis Doctorales / Doctoral Thesis

- Susana Prieto Aramburu. Una vía de desacoplamiento en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Autónoma de Madrid, 1994. Director: E. Rial.
- Ignacio Arechaga Iturregui. Relaciones estructura-función en la proteína desacoplante de las mitocondrias del tejido adiposo pardo. Universidad Autónoma de Madrid, 1994. Director: E. Rial.

### Científicos Invitados / Visiting Scientists

- Dr. Frédéric Bouillaud, Centre de Recherche sur l'Endocrinologie Moleculaire et le Developpement (CNRS), Meudon, Francia. (II,VI,XII-1993; IX a X-1994).

### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- CICYT, BIO93-0544-C03-02 (1993-1996)

### Publicaciones / Publications

- Arechaga, I., Raimbault, S., Prieto, S., Levi-Meyrueis, C., Zaragoza, P., Miroux, B., Ricquier, D., Bouillaud, F. and Rial, E.: Cysteine residues are not essential for uncoupling protein function. *Biochem. J.* 296, 693-700, 1993.
- Bouillaud, F., Arechaga, I., Petit, P.X., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Casteilla, L., Laurent, M., Rial, E. and Ricquier, D.: A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. *EMBO J.* 13, 1990-1997, 1994.
- Díaz-Achirica, P., Prieto, S., Ubach, J., Andreu, D., Rial, E. and Rivas, L.: Permeabilization of the mitochondrial inner membrane by short cecropin-A-melittin hybrid peptides. *Eur. J. Biochem.* 224, 257-263, 1994.

### Próximos Artículos / Forthcoming Papers

- Prieto, S., Bouillaud, F. and Rial, E.: The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in *S. cerevisiae*. *Biochem. J.* 307, 657-661, 1995.

# Biología Estructural y Funcional de Factores Endoteliales Vasoactivos

## *Structural and Functional Biology of Endothelial Vasoactive Factors*

Lab 1:

**GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**MARGARITA GARCÍA CALVO**

(Hasta VI-1994)

**ROSA LOZANO (1994)**

**JESÚS MIGUEL SANZ**

(Desde V-1994)

Investigadores Contratados

*Tenure-track Scientists*

**ISABEL MUÑOZ WILLERY**

**ANTONIO PINEDA LUCENA**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**MERCEDES ZAZO GUÍO**

Personal Técnico

*Technical Staff*

Lab 2:

**JUAN MANUEL RAMÍREZ DE VERGER**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**M.<sup>a</sup> LUISA NAVARRO RICO (1994)**

**JESÚS ZURDO ALAGUERO**

(Hasta III-1994)

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**CONCEPCIÓN FERNÁNDEZ CABRERA**

Personal Técnico

*Technical Staff*

Nuestros laboratorios están orientados hacia el estudio de factores de origen endotelial con implicaciones biológicas más amplias en otros sistemas celulares. El Dr. Giménez Gallego dirige desde hace años una línea de investigación sobre el factor de crecimiento para fibroblastos (FGF) con dos vertientes. La primera de ellas va dirigida a establecer las bases estructurales de las propiedades fisiológicas de esta proteína. En este contexto, este grupo ha podido establecer la estructura tridimensional en solución del FGF ácido en forma activa, tras haber encontrado un compuesto, el inositol hexasulfato, capaz de emular al activador natural de la proteína, la heparina, que por su heterogeneidad no es adecuada para estos estudios estructurales. La otra vertiente, se desarrolla en colaboración con el Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal, y su objetivo es explorar las potenciales aplicaciones clínicas de esta proteína. El desarrollo de estas aplicaciones se hace, en parte, tras el conocimiento de los resultados de los estudios estructurales.

El Dr. Santiago Lamas se incorporó al CIB a finales de 1993. Desde entonces, ha constituido un grupo de investigación cuyo objeto es el estudio de la biología del óxido nítrico, molécula plurifuncional con potente acción vasoactiva. Más concretamente se estudian las isoformas de óxido nítrico sintetasas (NOS) en células que expresan la isoforma inducible (iNOS) (mesangiales) y constitutiva (cNOS) (endoteliales). Se ha progresado en el conocimiento de la regulación de la expresión génica de la iNOS en células mesangiales de rata por glucocorticoides y an-

*These laboratories are oriented towards the study of endothelial-derived factors with ample biological roles in diverse cellular systems. Dr. Giménez Gallego's group has been working for several years on two aspects of fibroblast growth factor(s) (FGFs). The first has to do with the structural configuration which confers this protein its physiological properties. In this setting his group has been able to establish the three-dimensional structure of acidic FGF in solution in its active form. This was possible after proving that inositol hexasulfate could mimic heparin, the natural activator of FGF, but which does not lend itself to structural studies. The second aspect is developed in collaboration with the Research Department of Hospital Ramón y Cajal and its main aim is to elucidate potential therapeutic applications of this protein incorporating the information obtained in the structural studies.*

*Dr. Santiago Lamas joined CIB in late 1993. This recently established group is interested in the vascular biology of nitric oxide, a multifunctional molecule with potent vasoactive action. More specifically regulation of nitric oxide synthase(s) (NOSs) is studied using endothelial cells and mesangial cells as a model for the expression of the vascular constitutive and inducible isoforms, respectively. In this regard, the regulation of gene expression in rat mesangial cells by glucocorticoids and antioxidants has been described, as a follow-up of experimental work initiated at the University of Alcalá. At present two additional aims are pursued, the first one related to gene expression regulation of NOSs in cytokine-treated endothelial*

Lab. 3:

**SANTIAGO LAMAS** (DESDE XII-1993)

Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**DOLORES PÉREZ-SALA** (1994)

Investigadora Contratada  
*Tenure-track Scientist*

**MANUELA DÍAZ CAZORLA**

(DESDE IX-1994)

**MARTA SAURA REDONDO** (1994)

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**ROSA MARTÍNEZ DALMAU** (1994)

Personal Técnico  
*Technical Staff*

tioxidantes continuando una línea iniciada en la Universidad de Alcalá de Henares. En el momento actual se persiguen dos objetivos adicionales, el primero relacionado con la regulación de la expresión de la cNOS en el endotelio y el segundo, en colaboración directa con el laboratorio del Dr. Giménez Gallego, persiguiendo los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al efecto vasodilatador del FGF.

Paralelamente a su colaboración en la línea principal del grupo, el laboratorio del Dr. J. M. Ramírez de Verger investiga aspectos estructurales de las proteínas colectoras de luz de la membrana fotosintética bacteriana, cuyos cromóforos intrínsecos pueden ser utilizados para monitorizar cambios estructurales en la apo-proteína. En concreto, se estudia la contribución de las regiones extramembranales de la proteína LHII a su estructura terciaria y cuaternaria.

*cells and the second one, in direct collaboration with Dr. Giménez Gallego, directed towards the elucidation of the molecular mechanisms underlying the vasodilatory action of FGFs.*

*In parallel with his active participation in the main research projects, Dr. Ramírez de Verger investigates structural aspects of light-harvesting proteins in the bacterial photosynthetic membrane, whose intrinsic chromophors may be used to monitor structural changes in the apo-protein. More specifically, the contribution of extramembrane regions of LHII protein to the tertiary and quaternary structure is studied.*

### Tesis Doctorales / *Doctoral Thesis*

- Jesús Zurdo Alaguero. Análisis de la contribución del carotenoide a las propiedades de las proteínas colectoras de luz en bacterias purpúreas. Universidad Autónoma de Madrid, 1994. Director: J.M. Ramírez de Verger.

### Científicos Invitados / *Visiting Scientists*

- Alexander Y. Borisov, Profesor de Biofísica del Laboratorio Belozerskii, Universidad Estatal Lomonosov, Moscú. (Hasta III-1994).

### Organismos Financiadores / *Funding Agencies*

- DGICYT, PM 92-0008-C02-01 (1993-1995)
- CICYT, BIO 93-0544-C03-01 (1994-1996)
- DGICYT, PB-93 0044 (1994-1997)

### Artículos de Divulgación / *Press Articles*

- López-Ongil, S., Saura, M. y Lamas, S.: Biología Molecular de los factores endoteliales vasoactivos: endotelina-1 y óxido nítrico. Publicado en *«Investigación en Hipertensión»* pp. 11-21, *Excerpta Médica*, 1993.
- Melián, E., y Lamas, S.: Regulación del tono vascular por factores endoteliales vasoactivos. Publicado en: *Medicine, Tratado de Medicina Interna*, Vol. 6 (60), 2657- 2663, 1994.

**Publicaciones / Publications**

- Mollinedo, F., Martínez-Dalmau, R. and Modolell, M.: Early and selective induction of apoptosis in human leukemic cells by the alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH<sub>3</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 603-609, 1993.
- Mollinedo, F., Pérez-Sala, D., Gajate, C., Jiménez, B., Rodríguez, P. and Lacal, J.C.: Localization of rap1 and rap2 proteins in the gelatinase-containing granules of human neutrophils. *FEBS Lett.* 326, 209-214, 1993.
- Ramírez, J.M.: Fotosíntesis. Absorción y utilización de la luz en la membrana fotosintética. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. (Eds.) Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Interamericana McGraw-Hill, Madrid pp. 91-112, 1993.
- Zurdo, J., Fernández-Cabrera, C. and Ramírez, J.M.: A structural role of the carotenoid in the light-harvesting II protein of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem. J.* 290, 531-537, 1993.
- Aparicio, P.J., Witt, F.G., Ramírez, J.M., Quiñones, M.A. and Balandín, T.: Blue light-induced pH changes associated with NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> uptakes by the green alga *Monoraphidium braunii*. *Plant, Cell Environ.* 17, 1323-1330, 1994.
- Cuevas, P. and Giménez-Gallego, G.: Role of fibroblast growth factor in asbestosis. In: *Sourcebook on Asbestos Diseases*, vol. 8. (Eds) G. Peters and B. Peters. Butterworth publishers, Santa Mónica, USA, 1994.
- Cuevas, P., Carceller, C., Martínez-Murillo, R., Cuevas, B., Xiaobing, F. and Giménez-Gallego, G.: Nitrergic innervation of rat brain vasculature. *Neurological Res.* 16, 113-115, 1994.
- Cuevas, P., Carceller, F., Reimers, D., Xiaobing, F. and Giménez-Gallego, G.: Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in choroid plexus of the rat. *Neurological Res.* 16, 310-312, 1994.
- Cuevas, P., Carceller, G. and Giménez-Gallego, G.: Fibroblast growth factor and cerebral ischemia. *Neurological Res.* 16, 181-183, 1994.
- Cuevas, P., Revilla, C., Herreras, O., Largo, C. and Giménez-Gallego, G.: Neuroprotective effect of acidic fibroblast growth factor on seizure-associated brain damage. *Neurological Res.* 16, 365-369, 1994.
- Ding, J., Lu, D.J., Pérez-Sala, D., Ma, Y.T., Maddox, J.F., Gilbert, B.A., Badwey, J.A. and Rando, R.R.: Farnesyl-L-cysteine analogs can inhibit or initiate superoxide release by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 269, 16837-16844, 1994.
- Giménez-Gallego, G. and Cuevas, P.: Fibroblast growth factors, proteins with a broad spectrum of biological activities. *Neurological Res.* 16, 313-316, 1994.
- Pérez-Sala, D. and Mollinedo, F.: Inhibition of isoprenoid biosynthesis induces apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1209-1215, 1994.
- Pineda-Lucena, A., Jiménez, M.A., Nieto, J.L., Santoro, J., Rico, M. and Giménez-Gallego, G.: 1H-NMR assignment and solution structure of human acidic fibroblast growth factor activated by inositol hexasulfate. *J. Mol. Biol.* 242, 81-98, 1994.
- Pineda-Lucena, A., Nuñez de Castro, I., Lozano, R.M., Muñoz-Willery, I., Zazo, M. and Giménez-Gallego, G.: Effect of low pH and heparin on the structure of acidic fibroblast growth factor. *Eur. J. Biochem.* 222, 425-431, 1994.
- Varela, J., Ventas, P., Carreira, J., Barbas, J.A., Giménez-Gallego, G. and Polo, F.: Primary structure of lep d i, the main lepidoglyphus destructor allergen. *Eur. J. Biochem.* 225, 93-98, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Balligand, J.L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W., Kopzik, L., Lamas, S., Lowenstein, C.L., Kelly, R.A., Smith, T.W. and Michel, T.: Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1- $\beta$  and IFN- $\gamma$ . *Am. J. Physiol.* (in press, 1995).
- Brady, H.R., Lamas, S., Papyiani, K., Takata, S., Brenner, B.M. and Marsden P.A.: Transcellular biosynthesis of lipoxygenase products during interaction of neutrophils and glomerular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 268 (37), F1-F12, 1995.
- Pérez-Sala, D. and Mollinedo, F.: Inhibition of N-linked glycosylation induces early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *J. Cell. Physiol.* (in press, 1995).
- Pérez-Sala, D., Collado-Escobar, D. and Mollinedo, F.: Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J. Biol. Chem.* 270, 6.235-6.242, 1995.
- Ros, J., Jiménez, W., Lamas, S., Clària, J., Arroyo, V., Rivera, F. and Rodés, J.: Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology.* 21, 554-560, 1995.
- Saura, M., López, S., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D. and Lamas, S.: Regulation of inducible nitric oxide expression in rat mesangial cells and isolated glomeruli. *Kidney Int.* 47, 500-509, 1995.

# Biología Molecular de Bacterias Gram-positivas

## *Molecular Biology of Gram-positive Bacteria*

**PALOMA LÓPEZ GARCÍA**

Jefe de Grupo - Investigadora  
*Group leader - Senior Investigator*

**ASUNCIÓN DÍAZ CARRASCO**

B. Postdoctoral  
*Postdoctoral Fellow*

**MÓNICA AMBLAR ESTEBAN (1994)**

**FÉLIX LÓPEZ DE FELIPE TOLEDANO**  
B. Predoctorales  
*Graduate students*

**M.<sup>a</sup> ANGELES CORRALES GONZÁLEZ**

**PEDRO VALIENTE GARCÍA**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

### **Caracterización molecular de la ruta biosintética de folatos de *Streptococcus pneumoniae***

Los derivados de los folatos son cofactores esenciales de la biosíntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos en la mayoría de los organismos vivos. Las células de mamíferos poseen sistemas de transporte activo que les permite utilizar folatos presentes en los alimentos. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos carecen de dichos sistemas y deben sintetizar folatos. Por este motivo el tratamiento con inhibidores de la síntesis de folatos o de la función de dichos compuestos está siendo utilizada contra infecciones bacterianas. Sin embargo, los antifolatos utilizados hasta el momento aunque efectivos, provocan intolerancia en los pacientes y por tanto es necesario el diseño de nuevas terapias, que interfieran con la biosíntesis de los folatos. Para ello, se requiere un mayor conocimiento de la ruta biosintética de estos compuestos. Dentro de este contexto, en los últimos años en nuestro laboratorio estamos caracterizando los enzimas implicados en este proceso del microorganismo productor de neumonía *S. pneumoniae*. Se ha mostrado la existencia del operón sulABCD compuesto por cuatro genes que codifican cuatro enzimas implicadas en cinco etapas de la ruta biosintética de folatos. En nuestro trabajo previo se ha demostrado que Sula el producto de *sulA* posee actividad dihidropteroato sintetasa (catalizadora de la penúltima reacción de la ruta). Durante este bienio se ha determinado la secuencia de nucleótidos de los genes *sulB* y *sulC*, y purificado sus productos génicos SulB y SulC de 41 y 21 kDa, respectivamen-

### ***Molecular characterization of the folate biosynthetic pathway of Streptococcus pneumoniae***

*Folates derivatives are essential cofactors in the biosynthesis of purines, pyrimidines, and amino acids in most living cells. Mammalian cells possess an active transport system, which allow them the use of pre-formed folates. However, most bacterial species lack these systems and they must synthesize folates de novo. For these reasons, a combination of antifolates is effectively utilized against bacterial infections. However, a significant number of patients are intolerant to the compounds currently used, and thus new therapies have to be developed. These will require a better understanding of the folate biosynthetic pathway. In this context, our laboratory has been working during the last years on the characterization of Streptococcus pneumoniae enzymes involved in this process. We have shown the existence of the sulABCD operon composed of four genes encoding enzymes for five steps in the folate biosynthetic pathway. Prior work showed that Sula is a dihydropteroate synthase, which catalyzes an intervening step. During this period, the DNA nucleotide sequence of sulB and sulC was determined. The gene products, SulB and SulD, were purified and they correspond to polypeptides of 49 and 21 kDa, respectively. SulC has GTP cyclohydrolase activity and catalyzes the first step in the pathway. SulB apparently has dihydropteroate synthetase activity in that it complements a folC mutant of Escherichia coli and thus catalyzes the last step in the pathway. SulD is a bifunctional enzyme, which catalyzes the second and third steps of the pathway. SulD has*

te. Utilizando SulC purificado se ha demostrado que posee actividad GTP ciclohidrolasa y cataliza la primera etapa de la ruta biosintética. SulB aparentemente posee actividad dihidrofolato sintetasa, ya que complementa un mutante *folC* de *Escherichia coli* y por tanto cataliza la última etapa de la ruta. SulD es un enzima bifuncional, que cataliza las etapas segunda y tercera de la ruta debido a sus dos actividades: dihidroneopterin aldolasa (DHNA) y hidroximetil-dihidropterina pirofosfoquinasa (PPPK). La proteína nativa SulD es un trímero o tetrámero compuesto por subunidades de 31 kDa, y se disocia reversiblemente durante su purificación. Finalmente, la actividad DHNA requiere la forma multimérica de la proteína, mientras que la forma monomérica posee actividad PPPK.

#### **Caracterización del operón de utilización de citrato de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis***

El metabolismo del citrato juega un papel primordial en numerosas fermentaciones de productos alimentarios. El citrato puede ser fermentado por un número limitado de bacterias lácticas, entre las que se encuentra *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. La degradación de dicho compuesto conlleva a la formación de productos fermentativos tales como diacetilo, acetoina, butanodiol y acetaldehído. La producción del compuesto aromático diacetilo tiene un efecto importante en la calidad de los alimentos fermentados. Dicho efecto es positivo en los productos lácteos tales como la mantequilla o el queso, pero provoca un detrimento en la calidad de productos tales como la cerveza y el vino. Así, es un hecho la necesidad de controlar la producción de diacetilo en las fermentacio-

*dihydroneopterin aldolase (DHNA) and hydroxymethyl-dihydropterin pirofosfoquinase (PPPK) activities. The native SulD protein is a trimer or tetramer of a 31 kDa subunit, and it dissociated reversibly after purification. DHNA activity requires the multimeric protein, whereas PPPK is expressed by the monomeric form.*

#### **Characterization of the citrate utilization gene cluster of *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis***

*The citrate metabolism plays a major role in many food fermentations. The citrate can be fermented by a limited number of lactic acid bacteria, one of those is *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. Its degradation results in the formation of unusual fermentation products such as diacetyl, acetoin, butanediol and acetaldehyde. The formation of the aroma compound diacetyl can have a distinct effect on the fermented food. This effect can be positive as seen in dairy products such as buttermilk and cottage cheese, but it is detrimental in products such as beer and wine. Therefore, there is a strong need to control the production of diacetyl in the food industry in general. This can only be achieved by gaining complete insight in the mechanisms of citrate utilization by lactic acid bacteria. In this context, our group is characterizing the citrate transport system of *L. lactis* biovar *diacetylactis*. The citrate transport in this bacteria is mediated by the citrate permease P. This polypeptide is encoded by the *citP* gene carried by plasmid pCIT264. The DNA sequence of the region upstream of the *citP* gene was determined. Two partial overlapping open reading frames, *citQ* and *citR* were identified. These two genes, together with *citP*, constitute the *citQRP* cluster. Moreover, an IS-like ele-*



nes de alimentos. Este control sólo podrá conseguirse en el futuro mediante la elucidación de los mecanismos de utilización del citrato por las bacterias lácticas. En este contexto nuestro grupo está caracterizando el sistema de transporte de citrato de *L. lactis* biovar diacetilactis. El transporte de citrato en esta bacteria está mediado por la citrato permeasa P (CitP) codificada por el gen *citP* localizado en el plásmido pCIT264. Se ha determinado la secuencia de nucleótidos de la región localizada delante de *citP* y se han identificado dos genes superpuestos denominados *citQ* y *citR*. Estos genes, junto con *citP*, constituyen el operón *citQRP*. Además, se ha identificado una secuencia de inserción localizada entre el promotor transcripcional del operón *citQRP* y el gen *citQ*. Este elemento contiene un marco de lectura abierta (ORF1) con capacidad para codificar un polipéptido de 33 kDa. ORF1 es homóloga a dos ORFs superpuestas e incluidas en una secuencia de inserción de *Bacillus stearothermophilus*. Se ha mostrado que CitP es la única proteína requerida para el transporte de citrato en *L. lactis*. CitR, el producto de *citR*, de 13 kDa ha sido identificado mediante la utilización de un sistema de hiperexpresión de *Escherichia coli*. Se ha analizado en *L. lactis* la influencia de CitR suplementado en cis o trans sobre una fusión traduccional entre *citP* y el gen «reporter-*cat*». Este estudio ha revelado que las traducciones de *citR* y *citP* están acopladas y reguladas por CitR. El transcrito del operón *citQRP* está sometido a degradación específica después de tratamiento con rifampicina. Nuestro modelo de trabajo es que la expresión del operón está sometido a regulación post-transcripcional debido a procesamiento del mRNA en una estructura secundaria compleja y a represión traduccional mediada por CitR.

*ment located between the citQRP transcriptional promoter and the citQ gene was identified. This element includes an open reading frame (ORF1), which could encode a 33 kDa polypeptide. ORF1 is highly homologous to two overlapping open reading frames present in an IS of Bacillus stearothermophilus. We have shown that CitP is the only polypeptide required for the citrate transport in L. lactis. The citR gene product (CitR) has been identified as a 13 kDa polypeptide by overproduction in an Escherichia coli expression system. Genetic manipulation of the citQRP cluster and trans complementation studies have revealed that translation of citR and citP is coupled, and regulated by CitR. The citQRP mRNA is subjected to specific cleavage after addition of rifampicin to the bacterial culture. Our working model is that expression of the cit cluster is controlled at the post-transcriptional level by mRNA processing at a putative complex secondary structure and by translational repression mediated by CitR polypeptide.*

**Tesis Doctorales / Doctoral Thesis**

- Asunción Díaz Carrasco. Localización y función de los dominios enzimáticos de la DNA polimerasa I de *Streptococcus pneumoniae*. Universidad Autónoma de Madrid, 1993. Directora: P. López García.

**Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Ido. Christian Magni, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina. (I a II-1993).

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- NATO, 0119/88 (1988-1993)
- CEE, CI-CT90-0772 (1991-1994)
- CICYT-Boehringer Mannheim, PTR93-0037 (1993-1995)

**Publicaciones / Publications**

- López, P. and Lacks, S.A.: A bifunctional protein in the folate biosynthesis pathway of *S. pneumoniae* with dihydro-neopterin aldolase and hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase activities. *J. Bacteriol.* 175, 2214-2220, 1993.
- Díaz, A., Lacks, S.A. and López, P.: Multiple roles for DNA polymerase I in establishment and replication of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Microbiol.* 14, 773-783, 1994.
- López de Felipe, F., Corrales, M.A. and López, P.: Comparative analysis of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* and *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 112, 289-296, 1994.
- Magni, C., López de Felipe, F., Sesma, F., López, P. and de Mendoza, D.: Citrate transport in *L.lactis* biovar diacetylactis. Expression of the citrate permease P encoded by the citP gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 75-82, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- López de Felipe, F., Magni, C., de Mendoza, D. and López, P.: Organization and regulation of the *L. lactis* biovar diacetylactis citrate utilization gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 246, 590-599, 1995.
- López, P., Greenberg, B. and Lacks, S.A.: A cluster of four genes encoding enzymes for five steps in the folate biosynthetic pathway of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 177, 66-74, 1995.

# Bioquímica de *Leishmania*. Péptidos Eucarióticos con Función Antibiótica

## Biochemistry of *Leishmania*. Antibiotic Peptides from Eukaryotes

**LUIS RIVAS LÓPEZ**

Jefe de Grupo - Investigador

Group leader - Senior Investigator

**ALMUDENA GUINEA DÍAZ**

**SUSANA SERRANO BARRERO**

Investigadoras Asociadas

Associate Scientists

**ENRIQUE ÁLVAREZ FORTES (1994)**

**CARMEN CHICHARRO GONZALO**

**PILAR DÍAZ ACHIRICA**

**ANGELA OCAÑA MORENO (1994)**

B. Predoctorales

Graduate Students

### Mecanismo de acción de péptidos

**eucarióticos con efecto antibiótico.** Las cecropinas son péptidos monocatenarios implicados en la defensa de los insectos frente a agentes infecciosos. Su síntesis química y la de sus análogos se facilita por la ausencia de puentes disulfuro intracatenarios. En colaboración con el Dr. D. Andreu (Universidad de Barcelona), se ha estudiado el mecanismo de acción de péptidos híbridos cecropina-melitina en tres sistemas biológicos, el protozoo parásito *Leishmania*, la bacteria *Aeromonas salmonicida* (colaboración con Dra. C. Gutiérrez, CIB) y mitocondria de hígado de rata (colaboración con Dr. E. Rial, CIB). Estos péptidos interactúan electrostáticamente con las membranas biológicas, induciendo permeabilidad a protones en todos los sistemas ensayados. En *Leishmania* provocan alteraciones en la membrana plasmática, observadas en microscopía electrónica, y disminución del consumo de oxígeno. Se han identificado sistemas de resistencia del parásito basados en degradación y transporte de péptidos.

El péptido híbrido cecropina-melitina CP1 elimina al parásito tanto *in vivo* como *in vitro* a concentraciones micromolares. En la actualidad se estudian nuevos análogos derivados de melitina sobre *Leishmania* y bacterias con multiresistencia a los antibióticos.

### Cisteína-proteinasas de *Trypanosomatidae*.

Las cisteínas proteinasas constituyen una de las proteínas más abundantes en determinados estadios de los *Trypanosomatidae* y han sido definidas como dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos contra la leishmaniasis.

### Mechanism of action of eukaryotic

**antibiotic peptides.** Cecropins are monocatenary peptides involved in the immune defense against infectious agents in Insects. Chemical synthesis of these peptides and their analogs is affordable because they lack internal disulfide bonds and the number of residues is relatively short. In collaboration with Dr. David Andreu, we have studied the mechanism of action of hybrid cecropin A-melittin synthetic analogs in three biological systems: the parasitic protozoa *Leishmania*, the bacteria *Aeromonas salmonicida* (collaboration with Dr. C. Gutiérrez), and in rat liver mitochondria (collaboration with Dr. E. Rial). In all cases, there is an electrostatic interaction between these peptides and the negatively charged membrane components, followed by membrane permeation to protons. In *Leishmania* these peptides produce alterations in the plasma membrane of the parasite, as observed in electron microscopy, as well as impairment of the oxygen rate consumption by the parasite. One of the analogs, CP1, is lethal to the parasite at micromolar range both *in vivo* and *in vitro*. Actually we are studying antibiotic effect of new analogs from melittin on *Leishmania* as well as on bacterial strains with multiresistance to antibiotics.

### Cysteine proteinases from *Trypanosomatids*.

Cysteine proteinases are one of the most abundant proteins in some parasite stages, which prompted W.H.O. to consider these enzymes as preferential targets for the development of new therapeutic drugs to fight these infections.

Los estudios realizados sobre (Lpcys2), una cisteína proteinasa de *Leishmania* comprenden:

**a)** Estudios sobre su biosíntesis y procesamiento. Las cisteína-proteinasa de tripanosomátidos poseen una extensión C-terminal en la molécula precursora de considerable longitud. Hemos determinado que dicha extensión se encuentra implicada en la localización de esta proteinasa en el megasoma, una estructura lisosomal de gran tamaño, presente en la forma amastigote del parásito.

**b)** Efecto de las cisteínas proteinasas sobre el procesamiento antigénico por parte del macrófago. La cisteína proteinasa de *Leishmania* inhibe la presentación antigénica mediada por antígenos de clase II de proteínas exógenas en macrófagos murinos con efecto dosis-respuesta, posiblemente constituye parte de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune mediante sobredegradación del antígeno.

**c)** Definición de posibles epítomos secuenciales T y B mediante mapeo con péptidos basados en la secuencia de Lpcys2 de *Leishmania*. Los datos obtenidos indican que la mayor inmunogenicidad se localiza en el extremo N-terminal de la cisteína-proteinasa.

**d)** Modelado de la cisteína proteinasa. En el Servicio de Modelado de Proteínas se ha procedido a la obtención de un modelo de estructura tridimensional con definición de las cadenas laterales de los aminoácidos de la cisteína proteinasa mediante modelado de su secuencia sobre la estructura cristalográfica de actinidina, como etapa previa al posible diseño de inhibidores específicos

*The following aspects of the Leishmania cysteine proteinase have been studied:*

**a)** *Study on the biosynthesis and processing of the enzyme. Cysteine proteinases from Trypanosomatids have a long C-terminal extension in the precursor molecule. We have found that the C-terminal peptide is involved in the targeting of the cysteine proteinase towards the megasome, a giant lysosome present in amastigotes.*

**b)** *Inhibition of class II antigen presentation by cysteine proteinase from Leishmania. The cysteine proteinase produces a dose-dependent effect on antigen presentation by murine macrophages feeded with lysozyme. This antigen overdegradation effect could be part of the mechanisms used by the parasite to subvert the immune response of the host.*

**c)** *Mapping of sequential T and B epitopes in the cysteine proteinase by using synthetic peptides based in the proteinase sequence. The most immunogenic part of the proteinase resides in the N-terminal region of the molecule.*

**d)** *Proteinase modelling on the tertiary structure of actidinin. The high similarity between the sequences of actidinin and Leishmania cysteine proteinase allows the modelling on the crystallographic structure of actinidin. To date the Service of Protein Modelling has obtained a structure of the cysteine proteinase from Leishmania with the position of lateral chains defined. This is a previous step for the design of putative specific inhibitors for this proteinase.*

Los estudios actuales se han extendido a otras cisteína proteinasas procedentes de otros *Trypanosomatidae*.

*These studies on other Trypanosomatidae proteinases are in progress.*

**Regulación del metabolismo energético de *Leishmania*.** Se estudian las variaciones en la funcionalidad del metabolismo energético del parásito mediante transfección de parásitos con el gen de la proteína desacoplante de hamster y su papel en la supervivencia de *Leishmania* en cooperación con el grupo del Dr. E. Rial. Se ha obtenido una expresión correcta de la proteína y el estudio de su funcionalidad se encuentra en curso.

**Regulation of the energetic metabolism in *Leishmania*.** We are studying the variations in the energetic metabolism of parasites transfected with the uncoupling protein from hamster (collaboration with Dr. E. Rial) and their role in parasite survival and transformation. The protein is correctly expressed and their activity is under study.

#### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- CICYT, BIO88-0229-C02-01 (1992-1995)
- CEE, CII-CT91-0870 (1992-1994)

#### Publicaciones / Publications

- Álvarez Fortes, E. and Molina, R.: Entomología Molecular. En: *Nuevas Tendencias en Parasitología Molecular*. (Eds.) L. Rivas y M.C. López. CSIC. Madrid, pp. 419-430, 1993.
- McMahon-Pratt, D., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Zhang, Y., Manson, K., Bergman, C., Rivas, L., Rodríguez, J.F., Lohman, K., Ruddle, N. and Esteban, M.: Recombinant Gp46/M-2 Vaccinia virus protect against *Leishmania* infection. *Infect. Immun.* 61, 3351-3359, 1993.
- Pan, A.A., Duboise, S.M., Eperon, S., Rivas, L., Hodgkinson, V., Traub-Cseko, Y. and McMahon-Pratt, D.: Developmental life cycle of *Leishmania*. cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. *J. Euk. Microbiol.* 40, 213-223, 1993.
- Ponte-Sucre, A., Alonso, G., Martínez, C., Hung, A., Rivas, L. and Ramírez, J.L.: Isolation of two pyruvate kinase activities in the parasitic protozoan *Leishmania mexicana amazonensis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 466-471, 1993.
- Rivas, L., Chicharro, C. and Díaz-Achirica, P.: Sistemas de unión parásito-célula hospedadora en *Trypanosomatidae*. En: *Nuevas Tendencias en Parasitología Molecular*. (Eds.) L. Rivas y M.C. López. CSIC. Madrid, pp. 185-216, 1993.
- Rivas, L., Díaz-Achirica, P. and Chicharro, C.: Estructuras GPI en *Leishmania*. En: *Nuevas Tendencias en Parasitología Molecular*. (Eds.) L. Rivas y M.C. López. CSIC, Madrid, pp. 61-112, 1993.
- Díaz-Achirica, P., Prieto, S., Ubach, J., Andreu, D., Rial, E. and Rivas, L.: Permeabilization of the mitochondrial inner membrane by short cecropin A-melittin hybrid peptides. *Eur. J. Biochem.* 224, 257-263, 1994.
- Duboise, S.M., Vannier-Santos, M.A., Costa-Pinto, D., Rivas, L., Pan, A.A., Traub-Cseko, Y., De Souza, W. and McMahon-Pratt, D.: The biosynthesis, processing and immunolocalization of cysteine proteinases of *Leishmania pifanoi* amastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 68, 119-132, 1994.
- Fresno, M., Hernández-Muníaín, C., Rivas, L., Scharfstein, J and Bonay, P.: T.cruzi. Identification of a membrane cysteine proteinase linked through a lipid anchor. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 431-438, 1994.

# Estructura e Interacciones de las Proteínas de los Microtúbulos

## *Structure and Interactions of Microtubule Proteins*

**JOSÉ M. ANDREU MORALES**  
Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**ROSARIO GIL ALVÁREZ**  
Investigadora Asociada  
*Associate Scientist*

**M. GRACIELA PUCCIARELLI**  
MORRONE (Desde XII-1994)

**GERMÁN RIVAS CABALLERO**  
(Desde VIII-1993)  
Investigadores Contratados  
*Tenure-track Scientists*

**DANIEL G. LEYNADIER** (1994)  
B. Postdoctoral  
*Postdoctoral Fellow*

**J. FERNANDO DÍAZ PEREIRA** (1993)  
**JUAN EVANGELIO PALOMO**  
(DESDE IX-1993)

**JOSÉ M. DE PEREDA VEGA**  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**JOSÉ MORALES ALVAREZ**  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

**DAVID AYALA DE DIEGO** (1994)  
Asistente Voluntario  
*Research Assistant*

Nuestro grupo se interesa por las interacciones funcionales entre macromoléculas biológicas, centrándonos en las proteínas de los microtúbulos.  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -tubulina son proteínas eucarióticas que unen GTP, de peso molecular 50000. El dímero de  $\alpha\beta$ -tubulina ensambla no covalentemente formando microtúbulos, cilindros huecos constituidos por protofilamentos longitudinales. Los microtúbulos son dinámicos y organizan la arquitectura celular y el tráfico citoplásmico de membrana, mediante las proteínas asociadas y motoras que se unen a su superficie. Son también los constituyentes principales del huso mitótico, y el blanco de acción de diversas drogas antitumorales. La única proteína conocida parcialmente homóloga de tubulina es la proteína de división celular bacteriana FtsZ.

Para abordar las relaciones estructura-función implicadas en el ensamblaje de tubulina, los métodos que empleamos incluyen proteólisis limitada y secuenciación, métodos de predicción estructural, expresión y síntesis química de fragmentos de proteína, anticuerpos monoclonales específicos de secuencia, interacción proteína-ligando, CD y fluorescencia, DSC, ultracentrifugación analítica, microscopía electrónica, dispersión de rayos X de sincrotrón y modelado macromolecular.

**Estructura, función y modificación de tubulina.** Determinando los puntos de corte sobre el dímero de tubulina soluble y ensamblado en microtúbulos por un panel de proteasas, definimos secuencias de la superficie de tubulina que o bien están expuestas en la superficie de los microtúbulos o pueden ser funcionales en las interacciones tubulina-tu-

*Our group is interested in the functional interactions between biological macromolecules, among which we have focused on the microtubule system.  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -tubulin are eukaryotic GTP binding proteins of MR 50000. The  $\alpha\beta$ -tubulin dimer assembles forming microtubules, long hollow cylindrical non-covalent protein polymers. Microtubules are dynamic and organize cellular architecture and cytoplasmic membrane traffic, by means of the microtubule associated and motor proteins which bind to their surface. They are also main constituents of the mitotic spindle, and the target of diverse antitumour drugs. The only known relative of tubulin is the bacterial cell division protein FtsZ.*

*In order to understand the structural-functional relationships in the assembly of tubulin, our main approaches include limited proteolysis and sequencing, structural prediction methods, expression and chemical synthesis of protein fragments, site-directed monoclonal antibodies, protein-ligand binding methods, circular dichroism and fluorescence spectroscopy, DSC, analytical ultracentrifugation, electron microscopy, synchrotron X-ray scattering and macromolecular computer modelling.*

**Structure, function and modification of tubulin.** *The nicking points by a panel of proteases on the tubulin dimer and on assembled microtubules are being determined. This defines surface sequences of tubulin which are either exposed on microtubules, or presumably functional in the protein-protein interactions between tubulin molecules. This method is com-*

bulina. Este método es complementario del mapeo immunoquímico con un panel de anticuerpos monoclonales (*Cell Motil. Cytosk.* 26, 1-6, 1993).

Hemos caracterizado la estructura covalente, plegamiento y propiedades en solución de los fragmentos C-terminales de  $\alpha$ -tubulina(404-451) y  $\beta$ -tubulina(394-445) de vertebrado expresados en bacteria. Intentamos expresar y purificar otros fragmentos solubles mas grandes de tubulina, con el objetivo de obtener dominios funcionales susceptibles de determinar su estructura a alta resolución, y poder situarlos en la proteína completa y los microtúbulos.

**Cambios inducidos por los nucleótidos unidos a tubulina.** De forma análoga a otras proteínas que unen nucleótidos, la estructura y función de la tubulina están reguladas por la unión del fosfato gamma del GTP y un ión  $Mg^{2+}$  coordinado. La unión del nucleótido al sitio intercambiable de la subunidad  $\beta$  controla la autoasociación de la tubulina. Como resultado del ensamblaje del heterodímero en microtúbulos se hidroliza el GTP y la tubulina se transforma en el estado inactivo ligado a GDP de la proteína. La tubulina-GDP no ensambla espontáneamente formando microtúbulos, sino que forma anillos dobles. Por tanto los anillos constituyen el estado de ensamblaje a equilibrio que corresponde a la mayoría de tubulina-GDP generada en el interior de los microtúbulos. La conocida inestabilidad dinámica funcional de los microtúbulos esta probablemente relacionada con la tensión de la tubulina-GDP en su interior. La estructura de los anillos de tubulina-GDP en solución, recientemente determinada a 3 nm de resolución, constituye un claro ejemplo de este concepto, ya que corresponde a pa-

*plementary to immunochemical mapping with a panel of site-directed antibodies (Cell Motil. Cytosk. 26, 1-6, 1993).*

*The covalent structure, folding and solution properties of bacterially expressed C-terminal fragments of  $\alpha$ -tubulin(404-451) and  $\beta$ -tubulin(394-445) have been characterized. The expression and purification of other, larger soluble fragments of tubulin is planned, with the aim of obtaining functional domains suitable of high resolution structural determination and their mapping into tubulin and microtubules.*

***The nucleotide switches of tubulin.***

*In analogy to other nucleotide binding proteins, the structure and function of tubulin is controlled by the binding of the gamma phosphate of the nucleotide and a coordinated  $Mg^{2+}$  ion. The binding of nucleotide to the exchangeable site of the  $\beta$  subunit controls tubulin self-associations. As a result of assembly of the tubulin heterodimer into microtubules GTP is hydrolysed, and the tubulin dimer switches into the GDP- $\beta$ -liganded, inactive state of the protein. GDP-tubulin will not spontaneously form microtubules, but double rings. Thus rings constitute the equilibrium assembly state corresponding to the majority of GDP-tubulin generated inside microtubules. The known functional dynamic stability of microtubules is likely related to the tensioning of GDP-tubulin within them (which makes these polymers intrinsically unstable). This is clearly exemplified by the solution structure of GDP-tubulin double rings, recently determined to 3 nm resolution, which corresponds to pairs of protofilament segments of microtubules curved tangentially to the microtubule surface (J. Mol. Biol. 238, 214-225, 1994).*

res de segmentos de protofilamentos vecinos, curvados tangencialmente a la superficie del microtúbulo (*J. Mol. Biol.* 238, 214-225, 1994).

Se sabe que, en contraste con la subunidad  $\beta$ , el nucleótido unido a  $\alpha$ -tubulina no se hidroliza, ni se intercambia. Por tanto carece de papel dinámico funcional. Sin embargo, resultados preliminares indican que el ion  $Mg^{2+}$  coordinado con el GTP unido a esta subunidad controla la estabilidad del heterodímero.

**Mecanismo de ensamblaje y estructuras de los microtúbulos inducidos por taxoides.** Taxol es un nuevo agente antitumoral de relevancia clínica, y el único ligando conocido que induce el ensamblaje de tubulina-GDP inactiva en microtúbulos, uniéndose exactamente una molécula de taxol por dímero de tubulina ensamblado. El análisis de la energética de las interacciones ligadas proteína-proteína y proteína-ligando sugiere que la unión de taxol cambia la conformación de la tubulina-GDP de activa a inactiva, y que el taxol podría constituir un ligando bifacial que participa en la interfase de contacto lateral entre moléculas de tubulina (*Biochemistry* 32, 2747-2755 y 10067-10077, 1993). Los microtúbulos ensamblados a partir de tubulina purificada y taxol tienen de media 12 protofilamentos, mientras que los microtúbulos inducidos por un análogo de cadena lateral tienen de media cerca de 13 protofilamentos, como los microtúbulos control. Se sugiere que el cambio en los contactos laterales entre moléculas de tubulina está ligado a la unión de la cadena lateral del taxol (*J. Biol. Chem.* 269, 31785-31792, 1994). Esto es compatible con un mecanismo sencillo en el que los taxoides se unan entre protofilamentos adyacentes.

*In contrast with the  $\beta$  subunit, the nucleotide bound to  $\alpha$ -tubulin is puzzlingly not exchanged or hydrolysed, but stays bound to the protein. Therefore, it lacks a dynamic functional role. However, preliminary results suggest that the  $Mg^{2+}$  ion coordinated with the GTP bound to the  $\alpha$  subunit controls the stability of the tubulin heterodimer.*

**Mechanism of assembly and structures of taxoid-induced microtubules.** Taxol is a new, clinically relevant antitumour drug, and the only known ligand which will drive inactive GDP-tubulin to assemble into microtubules. Exactly one molecule of taxol binds per assembled tubulin dimer. Analysis of the energetics of the linked protein-protein and protein-ligand interactions involved has suggested that taxol binding changes the conformation of GDP-tubulin from inactive to active, allowing productive binding and elongation at the microtubule end, and that taxol may be a double-sided ligand which participates in the lateral contact interface between tubulin molecules (*Biochemistry* 32, 2747-2755 and 10067-10077, 1993). Microtubules assembled from purified tubulin and taxol have on average 12 protofilaments, while microtubules induced by a semisynthetic side-chain analogue have an average close to 13 protofilaments, as control microtubules. This suggests that the change in lateral contact angle between tubulin molecules is linked to the binding of the taxol side chain (*J. Biol. Chem.* 269, 31785-31792, 1994), and is compatible with the simple mechanism in which taxoids would bind between adjacent microtubule protofilaments.



### **Tesis Doctorales / Doctoral Thesis**

- José Fernando Díaz Pereira. Ensamblaje de proteína inducido por ligando: polimerización de tubulina en microtúbulos ligada a la interacción con taxoides. Fac. de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 1994. Director: J.M. Andreu.

### **Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Dres. Octavio Monasterio y Rosalba Lagos, Universidad de Chile, Santiago, Chile (IX-1993).

### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PB92-0007 (1993-1996)
- DGICYT, PL-870220 (1991-93)
- EU Science Program contract SC1-CT91-0658 (1992-94)
- Programa de Cooperación Científica con IberoAmérica (1993-95)
- Daresbury Laboratory-EU Synchrotron Radiation Source awards 23/123, 24/56 (1994)
- CSIC, Acc. Estructura y Función de Proteínas (1994)

### **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, France.
- Laboratorio de Bioquímica, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Synchrotron Radiation Source, SERC Daresbury Laboratory, U.K.
- Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, U.S.A.

### **Publicaciones / Publications**

- Díaz, J.F. and Andreu, J.M.: Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry and competition. *Biochemistry* 32, 2747-2755, 1993.
- Díaz, J.F., Menéndez, A. and Andreu, J.M.: Thermodynamics of ligand-induced assembly of tubulin. *Biochemistry* 32, 10067-10077, 1993.
- Andreu, J.M. and de Pereda, J.M.: Site directed antibodies to tubulin. *Cell Motil. Cytoskeleton* 26, 1-6, 1993.
- Leynadier, M., Peyrot, V., Sarrazin, M., Andreu, J.M., Temple, C., Renner, G. and Briand, C.: Tubulin binding properties of two chiral isomers with 1-deaza-7,8-dihydropteridine structure. In: *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*. (Eds.) Ayling, J.E., Nair, M.G. & Baugh, C.M. *Adv. Exp. Med. and Biol.* 338, 465-468, 1993.
- Andreu, J.M.: La estructura y dinámica de sistemas biofísicos abordadas mediante técnicas de radiación de sincrotrón: ensamblaje de los microtúbulos. En: *La Radiación Sincrotrón en España*. (Eds.) Muñoz Páez, A. & González-Elipe, A.R. Publ. Universidad de Sevilla, 36, pp. 91-104, 1993.
- Leynadier, D., Peyrot, V., Sarrazin, M., Briand, C., Andreu, J.M., Renner, G.A. and Temple, C.: Tubulin binding properties of two 1-deaza-7,8-dihydropteridines with different biological properties: enantiomers NSC 613862 (S)(-) and NSC 613863 (R)(+). *Biochemistry* 32, 10675-10682, 1993.
- Andreu, J.M. and Arévalo, M.A.: Microtubule structure and assembly probed with synthetic peptides and site-directed antibodies. *Cell. Pharm.* 1(S1), S11-S16, 1993.

- Timasheff, S.N., Andreu, J.M., Gorbunoff, Medrano, F.J. and Prakash, V.: Mechanisms of Binding of Bidentate Ligands to Tubulin: The Colchicine and Vinca Alkaloid Drugs. *Cell. Pharm.* 1(S1), S27-S33, 1993.
- Peyrot, V., Leynadier, D., Sarrazin, M., Briand, C., Barasoain, I., De Inés, C., and Andreu, J.M.: Interaction of new compounds at the microtubular level. *Cell Pharm.* 1, 143-146, 1994.
- Serrano, S., Gil, R., Sola, A., Arregui, L. and Guinea, A.: Cytoskeletal organization of *Disematostoma colpidioides* (Ciliophora, Frontoniidae). *Acta Protozoológica* 33, 87-92, 1994.
- Callen, A.M., Adoutte, A., Andreu, J.M., Baroin-Torancheau, Bré, M.H., Calvo Ruiz, P., Clérot, J.C., Delgado, P., Fleury, A., Jeanmaire-Wolf, R., Viklicky, V., Villalobo, E. and Levilliers, N.: Isolation and characterization of libraries of monoclonal antibodies directed against various forms of tubulin in *Paramecium*. *Biol. Cell.* 81, 95-119, 1994.
- Díaz, J.F., Pantos, E., Bordas, J. and Andreu, J.M.: Solution structure of GDP-tubulin double rings to 3 nm resolution and comparison with microtubules. *J. Mol. Biol.* 238, 214-223, 1994. With an appendix:
- García de la Torre, J. and Andreu, J.M.: Hydrodynamic analysis of tubulin dimer and double rings. *J. Mol. Biol.* 238, 223-225, 1994
- Andreu, J.M., Díaz, J.F., Gil, R., de Pereda, J.M., García, M., Peyrot, V., Briand, C., Towns-Andrews, E. and Bordas, J.: Solution structure of Taxotere-induced microtubules to 3 nm resolution. The change in protofilament number is linked to the binding of the taxol side chain. *J. Biol. Chem.* 269, 31785-31792, 1994.
- Blanco, F.J., Rivas, G. and Serrano, L.: A short linear peptide that folds into a native stable beta-hairpin in aqueous solution. *Nature Struct. Biol.* 1, 584-590, 1994.

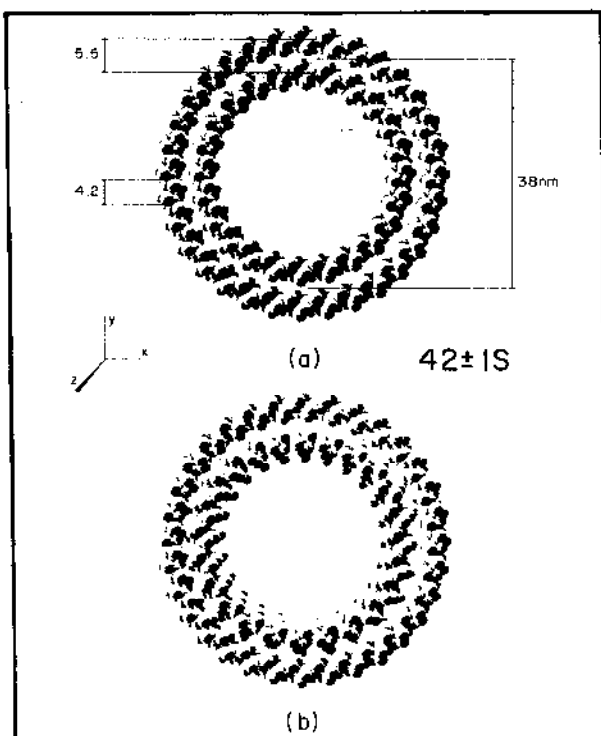


Figura: Modelo computacional de los dobles anillos de tubulina-GDP que mejor se ajusta a su perfil de dispersión de rayos X de sincrotrón. El diámetro medio medido, y las distancias entre monómeros en cada anillo y entre los dos anillos se indican en nm. El anillo externo contiene 32 monómeros y el interno 24, cada uno representado por un conjunto de 21 esferas de radio 1.2 nm, aproximadamente dentro de un clipsoide triaxial (J.F. Díaz et al., *J. Mol. Biol.* 238, 214-225, 1994). El coeficiente de sedimentación calculado para este mismo modelo mediante teoría hidrodinámica rigurosa coincide con el valor experimental,  $42 \pm 1$  S (J. García de la Torre & J.M. Andreu, *J. Mol. Biol.* 238, 223-225, 1994)

Figure: Computer model of GDP-tubulin double rings which best fits their synchrotron X-ray scattering profile. The measured mean diameter, the centre to centre spacing between monomers in each ring, and the spacing between both rings are indicated in nm units. The outer and inner ring contain 32 and 24 monomers, respectively. Each tubulin monomer has been represented by a set of 21 solid beads of 1.2 nm radius within an approximately triaxial ellipsoidal envelope (J.F. Díaz et al., *J. Mol. Biol.* 238, 214-225, 1994). The sedimentation coefficient of this double ring model, calculated employing rigorous hydrodynamic theory is coincident with the experimental value,  $42 \pm 1$  S (J. García de la Torre & J.M. Andreu, *J. Mol. Biol.* 238, 223-225, 1994)

# Expresión de Antígenos de Leishmania

## Antigen Expression on Leishmania

**ALBERTO MARQUET ESPINOSA**

Jefe de Grupo  
Group leader

**VICENTE LARRAGA RODRÍGUEZ  
DE VERA**

Investigadores  
Senior Investigators

**GLORIA GONZÁLEZ**

**MERCEDES MARTÍN**

(Desde X a XII-1994)  
B. Predoctorales  
Graduate Students

**SOLEDAD GARCÍA CALDERET**

**RICARDO MUTUBERRÍA (1994)**

Pregraduados  
Undergraduate Students

*Leishmania infantum* es la especie responsable de las infecciones producidas por este tripanosomátido en España y en la mayor parte de la cuenca norte mediterránea. En la actualidad y además de los 500.000 casos que se producen anualmente en el mundo, existe una preocupación en Europa por su creciente asociación con otras infecciones de gran repercusión (*Nature*, Dic, 1994). El proyecto de este grupo trata de caracterizar antígenos de la superficie del parásito capaces de inducir protección frente a la infección por el mismo así como determinar los fragmentos moleculares responsables de producir la respuesta inmune en el hospedador que controla la infección.

Para ello se están llevando a cabo los siguientes abordajes:

**a)** Se está procediendo a purificar diferentes antígenos del parásito entre los que se encuentran las glicoproteínas gp63 y gp46, muy abundantes en la superficie del parásito y que en otras especies del género han mostrado su capacidad de inducción de protección frente a la infección.

**b)** Hemos obtenido recientemente una línea de amastigotes axénicos lo que nos permitirá un estudio de las características de los mismos así como el estudio de la expresión diferencial de antígenos de superficie en los dos estadios del ciclo del parásito.

**c)** Se han obtenido genotecas de cDNA en lambda ZAPII y genómica en cLHYG procediéndose al clonaje de los genes

Visceral Leishmaniasis (VL) a protozoan infection distributed worldwide is caused at the northern mediterranean region by *L. infantum*. There is an increasing concern in Europe due to the increasing sympathy between VL and HIV to produce coinfections. The present project of this group attempts to characterize *L. infantum* surface antigens as well as to determine the antigenic fragments able to elicit the immune response and subsequently to protect against the infection. The following step will be to develop a recombinant vaccine.

The main approaches to the project are:

**a)** *L. infantum* surface antigens, between them the main glycoproteins gp46 and gp63 are currently being purified and specific antibodies against them obtained.

**b)** An axenic line of *L. infantum* amastigotes was obtained. This will allow to compare the surface antigen expression between the intracellular and extracellular phases of the parasite.

**c)** The construction of cDNA and genomic libraries from *L. infantum* in lambda ZAPII and cLHYG respectively has been done. Cloning of the corresponding genes to obtain the sequence in order to determine the T cell epitopes is being done.

**d)** To produce recombinant Vaccinia attenuated virus as a possible vaccine for the wild reservoir of the disease. This work is in progress in collaboration with Prof. M. Esteban (CNB, Madrid).

correspondientes que son identificados mediante el uso de oligonucleótidos con secuencias homólogas obtenidas a partir de *L. amazonensis*. Una vez obtenida la secuencia completa de los genes se utilizará como base para el estudio de los fragmentos responsables de provocar la respuesta inmune.

**d)** Asimismo se está procediendo en colaboración con el grupo del Dr. M. Esteban (CNB) a la expresión de proteínas de la superficie del parásito en virus *Vaccinia* atenuados para el posible desarrollo de una vacuna veterinaria frente a *Letshmania infantum*.

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CICYT, BIO92-0936-C02-01 (1992-94)
- FIS, 94/0021-01 (1994-96)
- CAM, C178 (1991-1993)
- CAM, A.E. (1994)

#### **Publicaciones / Publications**

- López-Bote, J.P., Langa, C., Lastres, P., Rius, A., Marquet, A., Ramos-Ruiz, R. and Bernabeu, C.: Aggregated human immunoglobulins bind to modified proteins. *Scand. J. Immunol.* 37, 593-601, 1993.
- Muñoz, E. and Larraga, V.: Evaluation of science policy in Spain. The formation of human resources (1960-1991) and the development of Spanish Biochemistry and Molecular Biology. *Biochemical Education* 21, 3, 1993.
- Ramos-Ruiz, R., Larraga, V., López-Bote, J.P., Bernabeu, C., Boog, C., Wauben, M. and van Eden, W.: Inhibition of T-cell proliferation by rat synoviocytes. *J. Autoimm.* 6, 557-569, 1993.
- Ávila, J., Candela, M. and Larraga, V.: Comment on spanish science and technology. *Sci. Public Policy* 21 (3), 184, 1994.

# Fotobioquímica Vegetal

## Plant Photobiochemistry

**PEDRO J. APARICIO ALONSO**

Jefe de Grupo - Investigador

Group leader - Senior Investigator

**MIGUEL A. QUIÑONES GÓMEZ**

Investigador Contratado

Tenure-track Scientist

**FEDERICO G. WITT**

B. Predoctoral

Graduate Student

El componente azul de la radiación solar juega un importante papel como agente modulador ambiental en una gran diversidad de procesos fisiológicos. Los organismos fotosintéticos eucarióticos requieren dicha radiación para que tenga lugar la asimilación del  $\text{NO}_3^-$ . Este anión, que constituye la principal fuente de nitrógeno para una gran variedad de algas y plantas superiores, necesita ser reducido hasta  $\text{NH}_4^+$  antes de ser incorporado a esqueletos carbonados. La reducción asimilatoria del  $\text{NO}_3^-$  se lleva a cabo secuencialmente por dos enzimas: nitrato reductasa y nitrito reductasa. En el alga verde *Monoraphidium braunii*, la síntesis de la nitrito reductasa y la activación de la nitrato reductasa son dos procesos inducidos por la luz azul.

Nuestros resultados más recientes indican que en este alga la incorporación del  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_2^-$ ) también requiere la presencia de radiación azul en la luz actínica. Esta señal luminosa también induce la entrada de otros aniones monovalentes que poseen una gran importancia fisiológica, como el  $\text{Cl}^-$ . Además, éste último inhibe de forma competitiva la entrada del  $\text{NO}_3^-$ . Adicionalmente, los espectros de acción de ambos transportes muestran un perfil idéntico que coincide con el del espectro de absorción de las flavinas, compuestos que parecen actuar como pigmentos fotosensibilizadores en la activación de dichos procesos. El paralelismo que muestran las cinéticas de los transportes del  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_2^-$ ) y del  $\text{Cl}^-$ , su fotorregulación y su biosíntesis, sugieren que estos dos aniones comparten un mismo mecanismo de entrada en las células de *M. braunii*.

*The blue component of the solar radiation plays an important role in the modulation by the environment of a many of physiological processes. The photosynthetic eucaryotic organisms require this type of radiation to assimilate  $\text{NO}_3^-$ . This anion constitutes the main nitrogen source for a large variety of algae and higher plants and has to be reduced to  $\text{NH}_4^+$  before being embodied in carbon skeletons. The assimilatory reduction of  $\text{NO}_3^-$  is performed by two enzymes: nitrate reductase and nitrite reductase. In the green alga *Monoraphidium braunii*, nitrite reductase biosynthesis and nitrate reductase activation are two processes induced by blue light.*

*Our most recent results indicate that in this alga,  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_2^-$ ) uptake also requires the presence of blue radiation in the actinic light. This light signal also induces the entrance of other monovalent anions of great physiological relevance, like  $\text{Cl}^-$ . Furthermore, this anion competitively inhibits the uptake of  $\text{NO}_3^-$ . Additionally, the action spectra of both uptakes show identical profiles matching the absorption spectrum of flavins, which are compounds that may act as chromophores in the activation of these processes. The similitude between the kinetics of both  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_2^-$ ) and  $\text{Cl}^-$  uptakes, their photoregulation and biosynthesis of the required components, suggest that these anions share the same uptake mechanism in *Monoraphidium braunii* cells.*

*On the other hand, we have studied the possible role of carotenoids as blue light photoreceptors in higher plants. Recent results seem to indicate the the xan-*

Por otro lado, hemos estudiado el posible papel de carotenoides como fotorreceptores de luz azul en plantas superiores. Los resultados más recientes parecen sugerir que la xantofila zeaxantina podría participar como pigmento fotorreceptor en la respuesta fototrópica de coleoptilos de maíz (*Zea mays*) y también en la apertura estomática dependiente de luz azul de plantas de algodón (*Gossypium barbadense*).

*thophyll zeaxanthin may participate in the sensory transduction of the phototropic response of corn (Zea mays) coleoptiles and the blue light-dependent stomatal opening in cotton (Gossypium barbadense) plants.*

*We expect to identify the photoreceptor(s) involved in the monovalent anion uptakes in green algae and characterize the signal transduction process.*

Se espera identificar la naturaleza del(los) fotorreceptor(es) implicado(s) en la incorporación de los aniones monovalentes en algas verdes, así como caracterizar el proceso de transducción de la señal luminosa.

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

– DGICYT, PB92-0497 (1993-1996)

#### **Publicaciones / Publications**

- Aparicio, P.J., Witt, F.G., Ramírez, J.M., Quiñones, M.A. and Balandín, T.: Blue light induced pH changes associated with  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{Cl}^-$  uptakes by the green alga *Monoraphidium braunii*. *Plant Cell Environ.* 17, 1323-1330, 1994.
- Witt, F.G. y Aparicio, P.J.: Caracterización de la incorporación de aniones monovalentes inducida por la luz azul en *Monoraphidium braunii*. *Nutrición Mineral de Plantas*. (Ed.) M.<sup>a</sup> del Carmen Álvarez Tinau, pp. 21-29, 1994.

#### **Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Aparicio, P.J., Witt, F.G., Ramírez, J.M., Quiñones, M.A. and Balandín, T.: Incorporación de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{Cl}^-$  en el alga verde *Monoraphidium braunii* inducida por luz azul. Ed. Miguel G. Guerrero. Publicaciones de la Universidad de Sevilla. (in press, 1995).
- Blasco, R., Aparicio, P.J. and Castillo, F.: Photoinactivation of the detoxifying enzyme nitrophenol reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* (in press, 1995).
- Witt, F.G. and Aparicio, P.J.: Effects of short pulses of blue light on the alkalization associated with the uptakes of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  by *Monoraphidium braunii*. Action spectra of the  $\text{Cl}^-$ —and  $\text{NO}_3^-$ —dependent alkalization. *Photochem. Photobiol.* (in press, 1995).
- Witt, F.G., Quiñones, M.A. and Aparicio, P.J.: Photoregulation of the uptake of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{Cl}^-$  by the green alga *Monoraphidium braunii*. En: *Plant Membrane Biology*. Eds. P. Brodelius, C-M. Larsson and I.M. Møller. Oxford University Press. (in press, 1995).

# Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-positivas

## *Replication and Expression of DNA in Gram-positive Bacteria*

**MANUEL ESPINOSA PADRÓN**

Jefe de Grupo  
*Group leader*

**M.<sup>a</sup> TERESA PÉREZ DE UREÑA**

Investigadores  
*Senior Investigators*

**ANTONIO PUYET CATALINA**

(Hasta VII-1993)

**GLORIA DEL SOLAR DONGIL**

Investigadores Contratados  
*Tenure-track Scientists*

**ELISABETH GROHMANN** (Desde XII-94)

B. Postdoctoral  
*Postdoctoral Fellow*

**PALOMA ACEBO PAÍS**

**LEDA GUZMÁN MALUENDA**

**ANA M. HERNÁNDEZ ARRIAGA**

**GABRIELA KRAMER XAVIER**

**MIRIAM MOSCOSO NAYA**

B. Predoctorales  
*Graduate students*

**M.<sup>a</sup> TERESA ALDA LÓPEZ**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

### 1. Replicación del plásmido pLS1

Se han desarrollado los siguientes aspectos:

**Análisis del represor transcripcional CopG.** Esta proteína es un represor transcripcional de su propia síntesis y de la síntesis de la proteína iniciadora de la replicación de pLS1, RepB. El operón *cop-rep* se transcribe desde un promotor único, Pcr, el cual contiene la diana de CopG. Se ha purificado CopG con una pureza superior al 98%. En colaboración con otros equipos de trabajo, se ha desarrollado un método para la síntesis química completa de CopG. Se ha demostrado que la proteína de origen químico tiene el mismo comportamiento que la de origen biológico en cuanto a su capacidad de generación de complejos con DNA, y a su represión específica de la síntesis de mRNA desde el promotor Pcr. Se han aislado mutantes en *copG*, que resultan en plásmidos con números de copias aumentados con respecto al plásmido parental. Asimismo, se han aislado mutaciones en la región de DNA a la cual se une CopG. Se han comenzado los análisis de estequiometría y afinidad de CopG por su operador silvestre y por operadores mutantes.

**Papel de curvaturas en el DNA de pLS1.** Se han analizado las características estructurales del DNA de pLS1 en la región del origen (+) de replicación. Se ha estudiado la influencia de curvaturas en regiones 5' de promotores en su actividad transcripcional. Se ha demostrado que es posible controlar la expresión de algunos genes (*fur* de *Escherichia coli*; *rnaII* de pLS1) mediante un adecuado

### 1. Replication of plasmid pLS1.

The following lines have been developed:

**Analysis of the CopG transcriptional repressor.** CopG represses, at the transcriptional level, its own synthesis and the synthesis of the initiator of replication protein, RepB. The *cop-rep* operon is transcribed from a single promoter, Pcr, which contains the target of CopG. The protein has been purified over 98% of purity. In cooperation with other groups, a method for the complete chemical synthesis of CopG has been developed. We have shown that the chemical protein exhibits the same behaviour as the biological one with respect to: i) ability to generate protein-DNA complexes, and ii) specific inhibition of the mRNA synthesis from promoter Pcr. Several *copG* mutants have been isolated, and all of them resulted in a phenotype of increased copy numbers, as compared to the parental plasmid. Mutations in the CopG target DNA have been isolated. We have started the analysis of the stoichiometry and affinity of CopG for wild type and mutant operators.

**Role of curvatures of pLS1 DNA.** The structural features of the DNA of pLS1 at the plasmid origin (+) of replication have been studied. In addition, we have analyzed the role of curved DNA in regions located 5' of promoters on the promoter strength. We have shown that expression of some genes (*E. coli fur* operon, *rnaII* from pLS1) can be regulated through a proper positioning of the CopG target at positions upstream of the promoters of

posicionamiento de la diana de CopG en regiones situadas a 5' de los promotores para los genes deseados. Se ha propuesto la existencia de una correlación directa entre curvaturas en el DNA y expresión génica.

**Control de replicación por RNAs antisense.** Se han definido los principales determinantes de incompatibilidad de pLS1. En primer lugar, la región de DNA que codifica para el RNA antisense RNA II ha mostrado ser el principal determinante *inc* de pLS1, cuando se suministra en trans y en un alto número de copias. Se ha sintetizado *in vitro* este RNA II, mostrándose que posee una longitud de unos 50 nucleótidos. Se han determinado los sitios de inicio y terminación del RNA II, y se ha comenzado el estudio de interacciones RNA II-mRNA *cop-rep*.

**Iniciación y origen de replicación de la cadena líder.** Se ha definido «in vivo» el origen (+) mínimo de replicación de pLS1. Se ha purificado RepB y caracterizado su actividad nucleotidiltransferasa de DNA. Se han estudiado los parámetros de reconocimiento de DNA superenrollado por la proteína RepB pura. Se han estudiado las interacciones entre RepB y su DNA diana en cuanto a la actividad de la proteína para cortar y sellar oligonucleótidos sintéticos monocatenarios que contienen el sitio de reconocimiento de RepB. Se han aislado mutantes de RepB, afectados bien en su extremo N-terminal, o bien en el C-terminal, y se ha iniciado la construcción de otros mutantes en *repB* por mutagénesis dirigida.

**Replicación de la cadena retrasada.** Se ha caracterizado la replicación de pMV158 (plásmido parental de pLS1) desde los dos orígenes de cadena retrasada que este plásmido presenta. Se han

*the desired genes. We have proposed a relationship between DNA curvatures and gene expression.*

**Control of replication by antisense RNAs.** *We have defined the incompatibility determinants of pLS1. The DNA region encoding for the antisense RNA II is the main inc determinant of the plasmid, when it is provided «in trans» and at a high dosage. RNA II has been synthesized «in vitro», and its starting and termination transcription points have been determined. RNA II is 50 nucleotides long. We have initiated the study of the interactions between RNA II and the cop-rep mRNA.*

**Origin and initiation of replication of the leading strand.** *We have defined «in vivo» the minimal origin(+) of replication of plasmid pLS1. The initiator protein, RepB, has been purified and characterized. The protein exhibits DNA-nucleotidyltransferase activity. We have studied the parameters involved in the recognition of RepB on supercoiled DNA. We have also analyzed the interactions between RepB and its target DNA on the ability of the protein to nick and to close single-stranded oligonucleotides which contain the recognition site of RepB. We have isolated mutants in RepB affected in its N- or C-terminal ends, and we have started the construction of new mutants in the repB gene by site-directed mutagenesis.*

**Lagging-strand replication.** *Replication from the one or the other of the two lagging-strand origins of plasmid pMV158 (parental of pLS1) have been characterized. Mutants in either one or the other origin have been constructed and characterized. Parameters governing DNA*



construido y caracterizado mutantes en uno u otro de los orígenes. Se han definido parámetros que afectan a la síntesis de DNA desde estos orígenes en tres especies bacterianas diferentes (factores del huésped, estructuras secundarias en el DNA).

### **Transferencia genética horizontal.**

Mediante técnicas de conjugación se ha transferido el plásmido RP4 entre *Escherichia coli*, y *Bacillus subtilis*, así como entre *E. coli* y bacterias del género *Streptococcus*. Se están optimizando y cuantificando los parámetros implicados en esta transferencia.

### **2. Utilización de maltosacáridos por *Streptococcus pneumoniae*.**

Se ha determinado la secuencia nucleotídica de los genes del operón *mal* de *S.pneumoniae* (implicado en la utilización de maltosacáridos) y procedido al análisis de la región (homologías, visualización de productos y mapeo de promotores). Mediante transcripción/traducción acopladas, hemos demostrado la expresión, «*in vitro*» de los productos génicos del operón, y se ha descubierto la existencia de dos nuevos genes en este operón, *malC* y *malA*. Se ha comprobado que parte del mRNA de esta región es procesado específicamente por RNasas del huésped. Se ha completado la secuencia nucleotídica de la región que incluye al gen *malR* (regulador del operón) y se ha procedido al análisis de la región. Se procedió al clonaje de *malR* en vectores de expresión para sobreproducir la proteína MalR. No obstante, y dado que la proteína produce agregados insolubles, se han realizado los primeros ensayos estructurales (contactos con DNA) a partir de sistemas de expresión «*in vitro*» por síntesis acoplada de mRNA y traducción «*in vitro*». Se han realizado también algunos ensayos funcionales de MalR con este sistema. Se han construido varios mutantes en *malR*.

*synthesis from the lagging strand origins (host-encoded factors, DNA secondary structures) have been studied in three bacterial species.*

**Horizontal gene transfer.** *Using different conjugation methods, the transfer of plasmid RP4 between different bacterial species (E.coli, B.subtilis, Streptococcus) has been achieved. We are in the process of optimization and quantification of several parameters involved in this transfer.*

**2. Maltosaccharide utilization by *Streptococcus pneumoniae*.** *We have completed the nucleotide sequence of the mal operon of S.pneumoniae (involved in maltosaccharide utilization by this bacterium). The entire region has been analyzed with respect to: i) identification of products; ii) mapping of promoters, and iii) sequence homologies. By coupled transcription/translation «in vitro» assays, we have visualized the gene products of the operon. Two new genes, namely malC and malA, have been discovered. We have observed that the mRNA of this region is subjected to specific processing by host-encoded RNases. In addition, the entire nucleotide sequence of the malR (the regulatory element of the operon) has been determined. Cloning of the gene in an expression vector showed that the protein was precipitated. However, by «in vitro» coupled transcription/translation assays, enough protein could be synthesized to assess that the protein binds to and bend its DNA target. Several mutants in the malR gene have been constructed.*

### Científicos Invitados / Visiting Scientists

- Ana Margarita Ibáñez..ICIDCA, Cuba. Predoctoral. (Hasta IV-1993).

### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- CICYT, BIO91/0691 (1991-1994)
- CICYT, BIO92-1018-CO2-02 (1992-1994)
- CAM, 190/92 (1992-1994)
- CICYT, BIO94-1029
- UE, Network CHRX-CT92-0010

### Artículos de Divulgación / Press Articles

- Del Solar, G. y Espinosa, M.: Plásmidos. *Investigación y Ciencia* 212: 32-33, 1994.
- Thomas, C.M., Wellington, E.M.H., Díaz-Orejas, R. and Espinosa, M.: Molecular biology and ecology of gene transfer and propagation promoted by plasmids. *Microbiology* 140: 1799-1801, 1994.

### Publicaciones / Publications

- Alonso, J.C. and Espinosa, M.: Plasmids from gram-positive bacteria. En: *Plasmids, a practical approach* (Ed.) K.G.Hardy. Second Edition. IRL Press, Oxford. pp. 39-63, 1993.
- Del Solar, G., Kramer, G., Ballester, S. and Espinosa, M.: Replication of the promiscuous plasmid pLS1: a region encompassing the minus origin of replication is associated with plasmid stable inheritance. *Mol. Gen. Genet.* 241, 97-105, 1993.
- Del Solar, G., Moscoso, M. and Espinosa, M.: *In vivo* definition of the functional *ori(+)* of replication of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Gen. Genet.* 237, 65-72, 1993.
- Del Solar, G., Moscoso, M. and Espinosa, M.: Rolling circle-replicating plasmids from gram-positive and -negative bacteria: a wall falls. (minireview) *Mol. Microbiol.* 8, 789-796, 1993.
- Del Solar, G., Moscoso, M. and Espinosa, M.: A family of highly related promiscuous plasmids. En: *Trends in Microbial Ecology* (Eds.) R.Guerrero and C.Pedrós-Alió. *Spanish Society for Microbiology.* pp.697-700, 1993.
- Pérez-Martín, J. and Espinosa, M.: Protein-induced bending could act as a transcriptional switch factor *in vivo*. *Science* 260 (5109), 805-807, 1993.
- Pérez-Ureña, M.T. and Espinosa, M.: Molecular cloning of a chromosomal DNA region encompassing the dihydrofolate reductase gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Current Microbiol.* 26, 11-16, 1993.
- Puyet, A. and Espinosa, M.: Structure of the maltodextrin-uptake locus of *Streptococcus pneumoniae*: correlation to the *Escherichia coli* maltose regulon. *J. Mol. Biol.* 230, 800-811, 1993.
- Puyet, A., Ibáñez, A.M. and Espinosa, M.: Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* maltosaccharide regulator MalR, a member of the LacI-GalR family of repressors displaying distinctive genetic features. *J. Biol. Chem.* 268, 25402-25408, 1993.
- Puyet, A. and Espinosa, M.: The maltose operons of *Streptococcus pneumoniae*: structure and regulation of gene expression. En: *DNA transfer and gene expression in microorganisms*. (Eds.) Balla, E., Berencsi, G. and Szentirmai. Intercept, Ltd. Andover. pp. 227-233, 1993.
- Del Solar, G., Albericio, F., Eritja, R. and Espinosa, M.: Chemical synthesis of a fully active transcriptional repressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5178-5182, 1994.
- Pérez-Martín, J. and Espinosa, M.: Correlation between DNA bending and transcriptional activation at a plasmid promoter. *J. Mol. Biol.* 421, 7-17, 1994.



**DEPARTAMENTO DE FISIOPATOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR HUMANA**  
**DEPARTMENT OF PHYSIOPATHOLOGY AND HUMAN MOLECULAR GENETICS**

---

Jefe de Departamento <i>Department Head</i>	<b>ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ</b>
Investigadores / Scientists Profesor de Investigación:	<b>ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ</b>
Investigadores Científicos:	<b>JOSÉ ANTONIO ABRISQUETA ZARRABE PILAR ALONSO SANJUAN ANTONIO MARTÍN GONZÁLEZ CARLOS RODRÍGUEZ MURCIA MATILDE SÁNCHEZ AYUSO</b>
Colaboradores Científicos:	<b>ÁNGELA CASADO MORAGÓN OFELIA GARCÍA HERMIDA GONZALO GÓMEZ ALARCÓN MARÍA A. JAREÑO CAÑADA ÁNGELES MARTÍN REQUERO</b>
Secretaría:	<b>OLVIDO PARTEARROYO LACABA</b>

---

# Estructuras Celulares

## Cellular Structures

---

**MARÍA A. JAREÑO CAÑADA**

Investigadora

Senior Investigator

---

Se han continuado los estudios sobre estructuras celulares, especialmente el núcleo, durante procesos de morfogénesis en células eucariotas (Ciliados). Los cromosomas politénicos se forman transitoriamente durante el desarrollo del macronúcleo. A pesar del tiempo transcurrido desde su descubrimiento (1964), características fundamentales son aún materia de discusión. El trabajo publicado demuestra la existencia de apareamiento somático de los cromosomas homólogos durante la formación de los cromosomas politénicos. Técnicas de biología y genética moleculares son necesarias para dilucidar el controvertido significado biológico de estos cromosomas y su posible función.

*It has been continued the study of cellular structures during processes of cellular morphogenesis in eukaryotic cells (Ciliates). Polytene chromosomes are formed transitorily during macronuclear development. In spite of the time passed from their discovery (1964), some physiological and even morphological characteristics are still in discussion. The last paper answers the question regarding the existence or not of somatic pairing during the development of these chromosomes. Techniques on molecular biology and genetics (that we are now carrying out) are necessary to elucidate the role and biological significance of these chromosomes.*

### **Publicaciones / Publications**

- Jareño, M.A.: Further studies on polytene chromosomes of *Stylonychia mytilus* (Ciliata Hypotricha). *Cytologia* 58, 293-297, 1993.

# Fijación Directa del N<sub>2</sub>

## *Direct N<sub>2</sub> Fixation*

---

**ANTONIO MARTÍN GONZÁLEZ**

Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**PILAR MARÍN LÓPEZ****MERCEDES MORENO PAZ****TILMAN SÁNCHEZ ELSNER**

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**M.<sup>a</sup> JOSÉ TOBAJAS MARTÍN**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

---

Estudiamos la fijación de N<sub>2</sub> por mutantes específicos de *Azotobacter* y *Azospirillum* para su empleo como biofertilizantes.

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

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

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

Estudiamos factores de crecimiento con mayor actividad.

Estudio clínico de una estirpe de *Lactobacillus acidophilus* capaz de reducir los niveles de colesterol en sangre, asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de disminuir la actividad de nitroreductasa en intestino.

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CSIC, (1988-1996)
- Norel, S.A. (1991-1995)
- Aplicaciones Magnéticas, S.L. (1994)

**Patentes / Patents**

- Martín, A., Moreno, M. and Martín, P.: Microbiological activation procedure in nitrogen fixation. Pat. N 92007B2 - N° Public. 204121, 1994.

**Publicaciones / Publications**

- Martín, A., Moreno, M. and Marín, P.: *Azotobacter* and *Azospirillum* as potential nitrogen fertilizers. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 24 (3-4), 255-260, 1993.

*We are studying the N<sub>2</sub> 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 try out new antivirals against different types of animal and vegetal virus.*

*We are studying growth agents with a higher activity.*

*Clinical research of an Lactobacillus acidophilus strain who reduces cholesterol values in blood, associated to low density lipoproteins (LDL) and decreased intestinal nitroreductase activity.*

# Genética Humana Human Genetics

---

**JOSÉ ANTONIO ABRISQUETA ZARRABE**

Jefe de Grupo  
Group leader

**PILAR ALONSO SANJUAN**

(Jubilada VI-1994)

**CARLOS RODRÍGUEZ MURCIA**

**CRISTINA IGLESIAS GUIASOLA**

Investigadores

Senior Investigators

**VITALINO ALLER RACIMO**

Investigador Asociado

Associate Scientist

**M.<sup>a</sup> AMPARO CERRAJERO**

**HERNÁNDEZ**

**M.<sup>a</sup> CARMEN PÉREZ LAMIGUEIRO**

**M.<sup>a</sup> TERESA ZORITA GONZÁLEZ**

Personal Técnico

Technical Staff

---

## Dislexia: Estudio de su posible etiología genética

Se ha llevado a cabo el estudio sobre la posible base genética de la dislexia, de acuerdo con el diseño presentado. La selección de la muestra de población se ha efectuado en colaboración con el Centro de Estudios de Aprendizaje y Reeducación (CEAR) de Madrid, el Centro «El Brot» de Barcelona y, ocasionalmente, con el Centro Reyes de Madrid. Pese a las limitaciones por falta de colaboración de algunas familias, se han podido analizar 113 individuos, distribuidos en 35 familias, siendo 41 el número de casos «índex». La forma de transmisión de la dislexia se ha comprobado que obedece a un patrón de herencia autosómico dominante. Entre los resultados del análisis citogenético cabe señalar un total de 71 heteromorfismos, destacando la variante 15p+, en la que se aprecia una banda G positiva en 15p11.2. Se han encontrado, además, dos anomalías cromosómicas de fórmula 47, XXY y 46, XX, t(12;19)(q24.1;p13.3). Finalmente, en el estudio dermatoglífico, la distribución de frecuencias de figuras digitales difiere significativamente de los valores obtenidos en una población control (n=206). En general, existe una mayor complejidad de figuras.

## *A study on the putative genetic aetiology of dyslexia*

*The study on the putative genetic basis of dyslexia has been fulfilled according to the presented project. The population sample selection has been carried out in collaboration with three specialized Institutions: «Centro de Estudios de Aprendizaje y Reeducación» from Madrid, the «El Brot» Centre from Barcelona, and occasionally the «Centro Reyes» from Madrid. In spite of some limitations due to the scarce or null collaboration of a few families, we were able to analyze 113 individuals distributed into 35 families, reaching to 41 the number of «índex» cases. The mode of inheritance of dyslexia has been shown to follow an autosomal dominant pattern. From the results of the cytogenetic analysis 71 heteromorphisms have been recorded, specially it is worth mentioning the 15p+ variant, showing a G-positive band at 15p11.2. Moreover, two chromosomal anomalies have been found: a 47, XXY boy and a 46, XX, t(12;19)(q24.1;p13.3) girl. Finally, concerning the dermatoglyphic analysis, the distribution of finger pattern frequencies in our dyslexic population sample is significantly different from that found in the control population (n=206). In general, the dyslexic population exhibits higher complexity in finger pattern.*

**Tesinas de Licenciatura / Master Thesis**

- Patricia Terán Herranz. El minusválido psíquico y su familia. Universidad P. Comillas. Madrid, 1994. Director: J.A. Abrisqueta.

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- FIS, 91/0185/Fundación Centro de Estudios y Aprendizaje y Reeducación
- CICYT, 1993-1994

**Artículos de Divulgación / Press Articles**

- Abrisqueta, J.A.: Genética Humana. *Prevenir* 8, 17, 1993
- Abrisqueta, J.A.: El futuro del ADN. *El Mundo*, Salud y Medicina, p. 5., 8-IV-1993.
- Abrisqueta, J.A.: La aventura de nacer. Fecundidad y planificación familiar. *Crítica* 1, 35-37, 1994.
- Abrisqueta, J.A.: Proyecto Genoma Humano: perspectivas y límites. *Verdad y Vida* 51, 204, 411-421, 1994.
- Abrisqueta, J.A.: Proyecto Genoma Humano: perspectivas y límites. *Noticias Médicas* n. 3539, 91-92, 1994.
- Abrisqueta, J.A.: Fases del desarrollo embrionario. *El Mundo*, Salud y Medicina, p.4, 29-IX-1994.

**Publicaciones / Publications**

- Abrisqueta, J.A.: Prevención de las deficiencias: consejo genético. *Acta Pediátrica Española* vol. 51, 1, 7-10, 1993.
- Abrisqueta, J.A.: Prevención de los defectos congénitos debidos a anomalías cromosómicas. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 59, 2, 159-179, 1993.
- Alonso, P.: Confirmación de la existencia de cromatina difusa (*puffed*) en los cromosomas politénicos de *Stilonychia mytilus* (Ciliophora, Hypotrichida). *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat.* (Sec. Biol.) 90, 81-87, 1993.
- Gargallo, M., Aller, V., De la Cruz, A. y Abrisqueta, J.A.: Pubertad espontánea y fertilidad en el síndrome de Turner. *Endocrinología*, vol. 40, 1, 66-67, 1993.
- Abrisqueta, J.A.: Estado actual de la investigación genética del síndrome de Down: mapa genotipo-fenotipo. Libro «10 años del Premio Reina Sofía de Investigación sobre Prevención de las Deficiencias». Serie Documentos: 40/93, 63-74, 1994.



# Hormonas y Neuropéptidos del Eje Entero-Insular

## *Hormones and Neuropeptides of the Entero-Insular Axis*

---

**OFELIA GARCÍA HERMIDA**

Jefe de Grupo - Investigadora  
*Group leader - Senior Investigator*

**LARS O. UTTENTHAL**

Investigador Asociado  
*Associate Scientist*

**TOMÁS FONTELA CASADO**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

---

### **Acciones de los péptidos GLP-1(7-36) amida y de la Amilina (islet amyloid polypeptide) en su papel como hormona y neuropéptido**

El péptido GLP-1(7-36) amida es la forma activa del primero de los dos péptidos análogos al glucagón situados en la porción C-terminal del proglucagón de mamíferos. Es secretado por las células enteroglucagón del intestino delgado en respuesta a la ingesta de los hidratos de carbono y de las grasas, y es el estímulo más potente de la secreción de insulina en presencia de la glucosa. Por esta razón, se propone como una de las hormonas más importantes del eje entero-insular en la regulación de la secreción postprandial de insulina, y como tal puede tener un papel significativo en el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 2. Es, también, un neuropéptido de distribución muy específica, pero de función desconocida, en el cerebro. Para evaluar el papel fisiológico del GLP-1(7-36) amida como hormona y como neuropéptido, hemos desarrollado una serie de anticuerpos monoclonales contra el péptido, los cuales se van a utilizar 1) para desarrollar un ELISA sensible, de tipo «sandwich», que pueda sustituir a los RIAs en la cuantificación del péptido; 2) para el bloqueo de las acciones del péptido en experimentos fisiológicos tanto *in vitro* como *in vivo* y 3) para el mapeo detallado, por técnicas inmunocitoquímicas, de la localización intracerebral de péptido y sus neuronas diana.

La amilina (polipéptido amiloide del islote) es una hormona que se aisló y ca-

### ***Actions of GLP-1(7-36) amide and amylin (islet amyloid polypeptide) as a hormone and neuropeptide***

*GLP-1 amide is the active form of the first of two glucagon-like peptides found in the C-terminal portion of mammalian proglucagon. It is secreted from the enteroglucagon cells of the small intestine in response to ingested carbohydrates and fats, and is the most potent stimulator of glucose-dependent insulin secretion known. It is thus a strong candidate hormone of the entero-insular axis for regulating postprandial insulin secretion, and as such may have a therapeutic role in diabetes mellitus type 2. It is also a neuropeptide of very specific distribution, but unknown function, in the brain. To evaluate the physiological role of GLP-1(7-36) amide as a hormone and neuropeptide, we have developed a panel of monoclonal antibodies against the peptide, which we plan to extend and to use 1) to develop a sensitive sandwich ELISA for measuring the peptide, to replace existing RIAs; 2) to block the actions of the peptide in physiological experiments in the pancreas, «in vivo» and «in vitro», and 3) to map the detailed intracerebral localization of the peptide and its target neurons by immunocytochemical techniques.*

*Amylin (islet amyloid polypeptide), a hormone isolated and characterized in 1986, is made in the pancreatic  $\beta$  cells and co-secreted into the blood with insulin in response to nutrients. It has been proposed that amylin works in concert with insulin to maintain metabolic equi-*

racterizó en 1986, se sintetiza en las células  $\beta$  del islote pancreático y es secretada a la circulación, junto con la insulina, en respuesta a determinados nutrientes. Se ha propuesto que la amilina puede actuar en colaboración con la insulina para mantener el equilibrio metabólico. En la actualidad estamos estudiando, en colaboración con las Dres. Marco y Silvestre (Clínica Puerta de Hierro) el posible efecto de la amilina, a concentraciones equivalentes a las descritas en tejidos o en la circulación, sobre la secreción basal o estimulada de insulina.

*librium. Currently we are studying, in collaboration with Drs. Marco and Silvestre (Clínica Puerta de Hierro) the possible influence of amylin, at concentrations equivalent to those reported in tissues or in the circulation, on basal and stimulated insulin release.*

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DIGICYT, PB920291-00(02) (1993-1995)
- Fundación Rodríguez Pascual, (1992-1993)

#### **Publicaciones / Publications**

- Uttenthal, L.O., Ghiglione, M., van Delft, J., García Hermida, O. and Fontela, T.: A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for glucagon-like peptide 1. *Digestion* 54, 395-396, 1993.
- Fontela, T., Silvestre, R.A., Salas, M., Marco, J. and García Hermida, O.: Inhibitory effect of lithium on glucose-induced insulin release in the perfused rat pancreas. *Lithium* 5, 95-98, 1994.
- García Hermida, O., Fontela, T., Ghiglione, M. and Uttenthal, L.O.: Effect of lithium on plasma glucose, insulin and glucagon in normal and streptozotocin-diabetic rats: role of glucagon in the hyperglycaemic response. *Brit. J. Pharmacol.* 111, 861-865, 1994.
- Rodrigo, J., Uttenthal, L.O., Bentura, M.L., Mikoshiba, K., Martínez-Murillo, R., and Polak, J.M.: Subcellular localization of the inositol 1,4,6-triphosphate receptor,  $P_{400}$ , in the vestibular complex and dorsal cochlear nucleus of the rat. *Brain Res.* 634, 191-202, 1994.
- Silvestre, R.A., Salas, M., García Hermida, O., Fontela, T. and Marco, J.: Amylin (islet amyloid polypeptide) inhibition of insulin release in the perfused rat pancreas: implication of the adenylate cyclase/cAMP system. *Reg. Peptides* 50, 193-199, 1994.

# Marcadores Tumoraes y Procesos de Envejecimiento

## *Tumoral Markers and Aging Processes*

---

**ANGELA CASADO MORAGÓN**

Jefe de Grupo - Investigadora

*Group leader - Senior Investigator*

**DIANA CARRASCOSA SÁEZ (1993)**

**JESÚS SANTOS DEL CURA**

(Desde XI-1993)

**M.<sup>a</sup> ROSARIO DE LA TORRE**

**BINIMELIS**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**M.<sup>a</sup> ENCARNACIÓN LÓPEZ**

**FERNÁNDEZ**

Personal Técnico

*Technical Staff*

---

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

La determinación de AFP se ha utilizado como marcador tumoral de determinados tipos de neoplasias (carcinomas de hígado y tumores germinales de testículo), y constituye un factor de pronóstico importante. Los objetivos de este trabajo se centran en la valoración sérica de AFP para determinar, en primer lugar, el diagnóstico de extensión de procesos cancerosos histológicamente diversos analizando su valor pronóstico y, en segundo lugar, estudiar la evolución de los niveles de AFP tanto en pacientes sin tratamiento previo, como en pacientes con tratamiento para estudiar en ambos casos la respuesta al tratamiento instaurado.

### **Radicales libres y envejecimiento**

Una de las principales teorías del envejecimiento es la de los radicales libres. Según esta teoría el proceso de los radicales libres implica daños continuados, causados por el oxígeno, en las células y tejidos del cuerpo conduciendo a la degeneración final y el envejecimiento. El cerebro tiene ciertas características que le hacen excepcionalmente vulnerable al ataque de los radicales libres. Tiene una estructura altamente oxigenada, responsable de casi la 1/5 parte del consumo de oxígeno del cuerpo, contiene gran cantidad de hierro y de ácidos grasos poliinsaturados y es relativamente pobre en núcleos antioxidantes como la catalasa. Además, el cerebro contiene grandes cantidades de compuestos fácilmente antioxidables, lípidos de membrana no sa-

### ***Alpha-fetoprotein as a tumoral marker***

*Serum Alpha-fetoprotein (AFP) has been confirmed as a reliable tumor marker in certain types of neoplasm (hepatocellular carcinoma and testicular germ cell tumors), and might be a useful tumor marker in evaluating the prognosis of patients. The objectives of this work is to measure serum AFP levels evaluating its value as a marker for various tumors and provide us with valuable information about stages and/or prognosis, and in the second place, to analyze the change of secretion of AFP in patients not having been treated and in patients requiring additional therapy to evaluate in both, the response to the treatment administered.*

### ***Free radicals and aging***

*One of the main theories of aging is the free radical theory of aging. According to this theory, free radical processes involving oxygen continuously damage cells and tissues in the body, leading to final degeneration and aging. The brain has certain attributes that make it exceptionally vulnerable to free radical attack. It is a highly oxygenated structure, responsible for almost one fifth of the body's total oxygen consumption, it contains large amounts of iron and polyunsaturated fatty acids and is relatively poor in many antioxidants, such as catalase. In addition the brain contains large amounts of easily antioxidizable compounds, unsaturated membrane lipids and catecholamines might be especially susceptible to oxygen toxicity. The free radicals*

turados y catecolaminas, que pueden ser especialmente susceptibles a la toxicidad del oxígeno. Los radicales libres implicados en la degeneración del cerebro son el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidróxilo. Las enzimas "scavenging" representan uno de los diversos mecanismos naturales de defensa frente a los daños inducidos por radicales libres, estas enzimas incluyen superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Para investigar el papel de estos dos enzimas en pacientes con desordenes cerebrales de envejecimiento, se valoró su actividad en enfermos con demencia tipo Alzheimer, demencia cerebrovascular, ic-tus y Parkinson, y los resultados obtenidos se comparan con los observados en la población sana y normal.

*implicated in the degeneration of the brain are the superoxide radical, hydrogen peroxide and the hydroxyl radical. Scavenging enzymes represent one of the several natural defense mechanisms against free radicals induced damage. These enzymes include superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). To investigate the role of these two enzymes in patients with aging brain disorders, it was measured their activity in patients with dementia of the Alzheimer type, cerebrovascular dementia, stroke and Parkinson's disease. The results obtained are compared with the ones observed in normal and healthy population.*

#### **Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Dr. Domenico Venarucci. C.N.R. Fermo (Italia), IX-1994.
- Dr. Vincenzo Venarucci. C.N.R. Fermo (Italia), IX-1994.

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CAM, CI28/91 (1991-1993)
- CSIC/CNR, Proyecto de Cooperación Hispano-Italiano, (1993-1994)
- Sociedad Española de Geriátría y Gerontología (1994-1995)

**Publicaciones / Publications**

- Carrascosa, D.: Clasificación general de Inmunoensayos. En: *Técnicas Inmunológicas: enzimmunoensayo y radioinmunoensayo* (Eds.). Public. P.F.P. del CSIC. Madrid. pp. 54-79, 1993.
- Casado, A., López-Fernández, M.E., Carrascosa, D., de la Torre, M.R., Ortiz de Urbina, D. and Santos, M.: Aging, cancer and oxygen free radical detoxificant enzymes. In: *Recent Advances in Aging Science*. (Eds.) F. Beregi, I.A. Gergely, K. Rajczi. vol. I. pp. 283-287 Monduzzi Editore (Italia) 1993.
- Casado, A.: Técnicas Inmunológicas. En: *Técnicas Inmunológicas: enzimmunoensayo y radioinmunoensayo* (Eds.). Public. P.F.P. del CSIC. Madrid. pp. 22-41, 1993.
- Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M.E., de la Torre, M.R., Chacón, J.I., Ortiz de Urbina, D. y Santos, M.: Incidencia y valor pronóstico de la Alfa Fetoproteína (AFP) en el cáncer de mama. En: *Biología de las Poblaciones Humanas: problemas metodológicos e interpretación ecológica*. (Eds). C. Bernis, C. Varea, F. Robles, A. González. pp. 921-927. Edics. Univ. Auton. Madrid, 1994.
- Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M.E., de la Torre, M.R., Ortiz de Urbina, D. and Santos, M.: Determinaciones séricas de Alfafetoproteína (AFP) en procesos tumorales de distinta etiología. *Neoplasia* 10, 44-47, 1994.
- Carrascosa, D., Ramírez, M.V., Casado, A., de la Torre, M.R., López-Fernández, M.E. and Sáez, J.: Prevalence of Hepatitis B virus markers in several institutions for the mentally handicapped in the Autonomous Community of Madrid. *Amer. J. Hum. Biol.* 7, 1-6, 1994.
- Casado, A., de la Torre, M.R., López-Fernández, M.E., Carrascosa, D., Casado, M.F. y Ramírez, M.R.: Envejecimiento: perfil sanitario de la población anciana de la C.A.M. En: *Biología de las Poblaciones Humanas: problemas metodológicos e interpretación ecológica*. (Eds.) C. Bernis, C. Varea, F. Robles, A. González. pp. 731-739. Edics. Univ. Auton. Madrid, 1994.
- Venarucci, D., Catalini, P., Casado, A.: Cytological and immunohistochemical comparative in breast cancer. *Eur. J. Cancer* 30A (2), 19, 1994.

**Próximos artículos / Forthcoming articles**

- Venarucci, D., Catalini, P., Venarucci, V., Vallese, A., Casado, A. and de la Torre, M.R.: Searching for a marker for Alzheimer's disease-Apo-E. *Panminerva Medica* . (in press, 1995).
- Venarucci, D., Catalini, P., Venarucci, V., Vallese, A., Casado, A. and de la Torre, M.R.: Evaluation of certain immunity parameters in rheumatoid arthritis, treated with cortisone. *Panminerva Medica*. (in press, 1995).

# Metabolismo y Patología Molecular

## Metabolism and Molecular Pathology

**ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ**

Jefe de Grupo

*Group leader*

Lab. Genética Molecular Humana:

**ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ**

Investigador

*Senior Investigator*

**CONSUELO GONZÁLEZ MANCHÓN**

**JUAN MENAYA FERNÁNDEZ**

(Desde VII-1993)

Investigadores Contratados

*Tenure-track Scientists*

**MARTA FERNÁNDEZ PINEL**

**MILAGROS FERRER ALDEA**

**JIANMING TAO (DESDE IX-1994)**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**M.<sup>a</sup> JOSÉ ARIAS-SALGADO ROSBY**

Personal Técnico

*Technical Staff*

Lab. Fisipatología Celular:

**MATILDE SÁNCHEZ AYUSO**

Investigadora

*Senior Investigator*

**NORA VIVIANA BUTTA**

**DOLORES IBARRETA RUIZ**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**ANA MARÍA RODRÍGUEZ MONGE**

Personal Técnico

*Technical Staff*

Lab. Regulación Metabólica:

**ÁNGELES MARTÍN REQUERO**

Investigadora

*Senior Investigator*

**FRANCISCO JAVIER DAZA BERTRAND**

B. Predoctoral

*Graduate Student*

### Regulación hormonal del metabolismo hepático

Los objetivos principales de este estudio son determinar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de gluconeogénesis y de ureogénesis, así como en la interrelación de dichas rutas metabólicas y de su control hormonal. Se ha prestado particular atención al estudio de los mecanismos de transducción de señales mediadas por agonistas movilizados de  $Ca^{2+}$ , en particular por la activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y su modulación por glucocorticoides y hormonas tiroideas.

### Patología y Genética molecular humana

Los proyectos en este área han pretendido: 1) Caracterizar funcionalmente células obtenidas de procesos patológicos humanos; 2) desvelar la existencia de alteraciones estructurales génicas asociadas a determinados cuadros patológicos humanos y establecer una correlación precisa entre cambios estructurales y funcionales. Para ello, se ha procedido a la clonación de genes mutantes, potencialmente responsables de alteraciones funcionales, y al estudio de sus propiedades funcionales. Esto se ha llevado a cabo mediante el análisis de los productos de su traducción en sistemas heterólogos o bien mediante la transfección de construcciones génicas en células mantenidas en cultivo.

Han sido objeto de atención en estos estudios:

### Hormonal regulation of the hepatic metabolism

*This research aims to study the molecular mechanisms involved in the regulation of gluconeogenesis and ureogenesis, as well as the interrelationship of these metabolic pathways and their hormonal control. A subject of special interest has been the study of the intracellular signaling pathway(s) of  $Ca^{2+}$  mobilizing receptors and their functional modulation by glucocorticoids and thyroid hormones.*

### Human Pathology and Molecular Genetics

*The research projects in these fields are aimed to: 1) the functional characterization of cells isolated from human pathological processes; 2) disclose the existence of gene(s) structural changes associated to human pathology and determine the precise relationship between the structural changes and the functional perturbations. For this purpose, we have cloned mutant genes, potentially involved in pathological processes, and studied their functional properties. The latter has been achieved by either analyzing the translational products of these genes expressed in heterologous systems or transfecting constructions of the mutant genes into the appropriate strain of cultured cells.*

*Special attention has been paid to the following subjects:*

*a) Regulation of ionic homeostasis in extraneural tissues and their role in the pathogenesis of Alzheimer's dementia.*

**a)** La regulación de la homeostasis iónica en células extraneurales y su papel en la etiología de la demencia de Alzheimer.

**b)** El estudio de las bases moleculares de la tromboastenia de Glanzmann.

**c)** La determinación de la correlación estructura-función de mutantes del receptor c-erbA $\beta$  humano.

**b)** *Elucidation of the molecular basis of the thromboasthenia of Glanzmann.*

**c)** *Structural-functional relationship of human c-erbA $\beta$  mutants receptors.*

### Científicos Invitados / *Visiting Scientists*

- Dr. Ramón B. Rodríguez Martínez, (Colaborador C.) Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, CSIC, Cádiz (Desde 1994).
- Dr N. Kieffer. Directora del Laboratorio de Investigaciones Médicas de Luxemburgo.

### Organismos Financiadores / *Funding Agencies*

- CAM, 142/92 (1992-1994)
- CICYT, SAL509/91 (1992-1994)
- FIS, 93/0162 (1993-1995)
- CEE-BIOMED-1 (1993-1995)
- DGICYT, 93/0163 (1994-1996)
- FIS, 94/0224 (1994-1996)

### Publicaciones / *Publications*

- Butta, N., Urcelay, E., González-Manchón, C., Parrilla R. and Ayuso, M.S.: Pertussis toxin inhibition of  $\alpha_1$ -adrenergic or vasopressin-induced  $Ca^{2+}$  fluxes in rat liver. Selective inhibition of the  $\alpha_1$ -adrenergic receptor-coupled metabolic activation. *J. Biol. Chem.* 68, 6081-6089, 1993.
- Martín-Requero, A., Ciprés, G., González-Manchón, C., Ayuso, M.S. and Parrilla, R.: Interrelations between ureogenesis and gluconeogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1158, 166-174, 1993.
- Martín-Requero, A., Ciprés, G., Rivas, T., Ayuso, M.S. and Parrilla, R.: Reciprocal changes in gluconeogenesis and ureogenesis induced by fatty acid oxidation. *Metabolism* 42, 1573-1582, 1993.
- Urcelay, E., Butta, N., Arias-Salgado, M.J., Ayuso, M.S. and Parrilla, R.: Characterization of the  $\alpha$ -adrenoceptor-mediated responses in perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1220, 49-56, 1993.
- Urcelay, E., Butta, N., González-Manchón, C., Ciprés, G., Martín-Requero, A., Ayuso, M.S. and Parrilla, R.: Role of protein kinase C in the  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated responses of perfused rat liver. *Endocrinology* 133, 2105-2115, 1993.
- Ciprés, G., Urcelay, E., Butta, N., Ayuso, M.S., Parrilla, R. and Martín-Requero, A.: Loss of fatty acid control of gluconeogenesis and PDH complex flux in adrenalectomized rats. *American J. Physiol.* 267, E528-E536, 1994.

- Fernández, M., Ferrer, M., González-Manchón, C., Ibarreta, D., Álvarez, M.V., García Muñoz, M., Ayuso, M.S. and Parrilla, R.: A novel mutation in the 5' splicing site of intron-6 of GPIIb cosegregates with clinical features of Glanzmann's thrombasthenia. In: *Advances in Gene Technology: Molecular Biology and Human Disease*. (Eds.) Whelan, W.J., Ahmad, F., Baumbach, L., Bialy, H., Black, S., Davies, K., Hodgson, J., Howell, R.R., Huijing, F. y Scott, W.A. IRL Press, 1994.
- Ferrer, M., Fernández, M., González-Manchón, C., Iruin, G., Ayuso, M.S. and Parrilla, R.: Identification of a G->A transition that substitutes GPIIb Arg<sup>358</sup> BY His<sup>358</sup> in a case of thrombasthenia of Glanzmann. In: *Advances in Gene Technology: Molecular Biology and Human Disease*. (Eds.) Whelan, W.J., Ahmad, F., Baumbach, L., Bialy, H., Black, S., Davies, K., Hodgson, J., Howell, R.R., Huijing, F. y Scott, W.A. IRL Press, 1994.
- Naranda, T, Strong, W.B., Menaya, J, Fabbri, B.J. and Hershey, J.W.: Two structural domains of initiation factor eIF-4B are involved in binding to RNA. *J. Biol. Chem.* 269, 14465-14472, 1994.
- Urcelay, E., Butta, N., Ciprés, G., Martín-Requero, A., Ayuso, M.S. and Parrilla, R.: Functional coupling of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers in the  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated activation of hepatic metabolism. *J. Biol. Chem.* 269, 860-867, 1994.

#### Próximos Artículos / Forthcoming Articles

- González-Manchón, C., Ferrer, M., Ayuso, M.S. and Parrilla, R.: Cloning, sequencing and functional expression of a cDNA encoding a NADP-dependent malic enzyme from human liver. *Gene* (in press, 1995).
- Ciprés, G., Butta, N., Urcelay, E., Parrilla, R. and Martín-Requero, A.: Impaired protein kinase C activation is associated to decreased hepatic  $\alpha_1$ -adrenoceptor responsiveness in adrenalectomized rats. *Endocrinology* 136, 468-475, 1995.
- Menaya, J., González-Manchón, C., Parrilla, R. and Ayuso, M.S.: Molecular cloning, sequencing and expression of a human liver NAD-dependent  $\alpha$ -glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* (in press, 1995).
- Rivas-Calleja, T., Urcelay, E., González-Manchón, C., Parrilla, R., and Ayuso, M. S. Role of amino acid-induced changes in ion fluxes in the regulation of hepatic protein synthesis. *J. Cell. Physiol.* (in press, 1995).



# Microbiología Aplicada

## Applied Microbiology

---

**GONZALO GÓMEZ ALARCÓN**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**BEGOÑA CILLEROS MARTÍN**

B. Predoctoral

*Graduate Student*

**JUANA M.<sup>a</sup> LORENZO VÍAN**

Personal Técnico

*Technical Staff*

---

Se han analizado la implicaciones de diferentes grupos microbianos y otros contaminantes ambientales en la alteración de los materiales constitutivos de varios monumentos pétreos. A tal fin, de varios edificios históricos de Alcalá de Henares, se aislaron y caracterizaron gran número de cepas bacterianas y fúngicas dotadas, algunas, de gran poder biodeteriorativo. La actividad microbiana sobre la superficie pétreo fue determinada por pruebas enzimáticas y las alteraciones de los minerales, los compuestos de neoformación y las partículas contaminantes fueron analizadas aplicando técnicas de espectroscopía FT-IR, difracción de rayos X y microscopía de barrido y EDAX. La pirólisis combinada con la cromatografía de gases-espectrometría de masas permitió la identificación sobre costras alteradas, de alcanos, alquenos, derivados carboxílicos, fenoles y otros compuestos, procedentes en su mayoría de la combustión de derivados del petróleo. Algunas de estas sustancias actúan como catalizadores y activan los procesos de biodeterioro.

Además se llevó a cabo un estudio completo de los microorganismos y organismos que colonizaban un monumento histórico, estableciendo la relación entre ellos, para comprender el papel ejercido por cada grupo microbiano en la alteración de los materiales pétreos.

*We have analyzed the influence of some microbial groups and other pollutants in the alteration of stone monuments. Various strains of bacteria and filamentous fungi were isolated and identified from the crusts and patinas of some buildings from the Alcalá de Henares (Spain). The depth of microbial colonization on the stones surface was estimated with enzymatic tests, the newly formed compounds and the pollutants particles were analyzed by means of FT-IR spectroscopy, X-ray diffraction and SEM-EDX. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry was used to study the organic compounds present on the stones of San Basilio church (Alcalá de Henares). n-Alkanes, alkenes, carboxylic derivatives, phenols, etc., were found on the damage crusts of this church.*

*An integrated study of the micro-organisms and organisms growing on a historic building was also carried out. It was established the relationships between the different organisms to understand the whole biodeterioration process.*

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CAM, 059/92 (1992-95)
- CEE, STEP, EV5V-CT92-0112 (1992-94)

**Colaboraciones con otros Centros / Working Collaborations with other Institutions**

- Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Sevilla.

**Publicaciones / Publications**

- Torre de la, M.A., Gómez-Alarcón, G. and Palacios, J.M.: «In vitro» biofilms formation by *Penicillium* frequentants strains on sandstone, granite, and limestone. *Appl. Microbiol. Biot.* 40, 408-415, 1993.
- Torre de la., M.A., Gómez-Alarcón, G., Vizcaíno, C. and García, M.T.: Biochemical mechanisms of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. *Biogeochemistry* 19, 129-147, 1993.
- Gómez-Alarcón, G. and de la Torre, M.A.: Mecanismos de corrosión microbiana sobre los materiales pétreos. *Microbiología SEM* 10, 110-120, 1994.
- Gómez-Alarcón, G. and de la Torre, M.A.: The effect of filamentous fungi on stone monuments. The Spanish experience. In: *Building Mycology*. (Ed.) J. Singh. Chapman and Hall. pp. 295-309, 1994.
- Torre de la, M.A. and Gómez-Alarcón, G.: Manganese and iron oxidation by fungi isolated from building stone. *Microbial Ecol.* 27, 177-188, 1994.



**DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA**  
**DEPARTMENT OF IMMUNOLOGY**

---

Jefe de Departamento <i>Department Head</i>	<b>SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA</b>
Investigadores / <i>Scientists</i> Investigadores Científicos:	<b>CARMELO BERNABEU QUIRANTE</b> <b>CARMEN GIL FERNÁNDEZ</b> <b>FAUSTINO MOLLINEDO GARCÍA</b> <b>SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA</b> <b>JOSÉ MARÍA ROJO HERNÁNDEZ</b>
Colaboradores Científicos:	<b>ISABEL BARASOAIN BLASCO</b> <b>ANGELES GARCÍA PARDO</b> <b>ANTONIO DE LA HERA MARTÍNEZ</b> <b>EDUARDO PÁEZ ABRIL</b> <b>AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ</b> <b>JOAQUÍN TEIXIDÓ CALVO</b>
Secretaría:	<b>OLVIDO PARTEARROYO LACABA</b>

---

# Activación de Linfocitos T

## *T-lymphocyte Activation*

**JOSÉ MARÍA ROJO HERNÁNDEZ**  
Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**GABRIEL CRIADO CARRASCO**  
**M.<sup>a</sup> JOSÉ FEITO CASTELLANO**  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**M.<sup>a</sup> LUISA DEL POZO DEL CAMPILLO**  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

La alteración funcional de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tiene importantes secuelas patológicas, que incluyen diversas enfermedades autoinmunitarias o el SIDA. En el reconocimiento de antígenos por linfocitos CD4<sup>+</sup> intervienen decisivamente no sólo receptores clonales, antígeno-específicos, sino otras moléculas de superficie entre las que destaca la propia molécula correceptora CD4.

En estudios recientes acerca de las funciones de CD4, hemos observado, por un lado, que hay una asociación de tirosina-quinazas al complejo del receptor para antígeno que es dependiente de CD4. Por otro lado, en líneas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en cultivo hemos podido aislar sublíneas con propiedades autorreactivas. Estudios con mutantes CD4<sup>+</sup> y transfectantes de CD4 muestran que entre los factores que influyen en la autorreactividad se cuenta la asociación, CD4-dependiente, de tirosina-quinazas al receptor para antígeno, así como otros cambios, poco estudiados, en la expresión de moléculas de superficie celular y en las señales intracelulares de activación. Esto, acompañado de un alto grado de independencia de «segundas señales» en la activación por antígeno, capacita a las células para reconocer efectivamente componentes propios y producir fenómenos de autoagresión.

Nuestra hipótesis de trabajo es que, en los modelos experimentales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que estamos estudiando, la autorreactividad se debe alteraciones celulares a distintos niveles que producen un descenso multifactorial en el umbral de activación por antígeno. En la actua-

*Functional alteration of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes have important pathological consequences, exemplified by certain autoimmune diseases or AIDS. Although antigen recognition in CD4 lymphocytes is mediated by clonally distributed, antigen-specific receptors, CD4 co-receptors greatly affect the outcome of antigen responses. In the course of previous studies on CD4 function, we have observed the acquisition of self-reactive properties in certain CD4<sup>+</sup> T cell sublines. Self-reactivity in these cells depends on numerous factors leading to low activation threshold. Analysis of CD4 mutants and CD4 transfectants show that CD4 dependent association of protein tyrosine kinases to the T-cell receptor is a prime factor for self-reactivity. However, our working hypothesis is that, in the experimental systems of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes under study, self-reactivity depends on many alterations at different cellular levels which should be determined. These lead to multifactorial decrease in the activation threshold through antigen receptors.*

*Current aims include looking for new surface or cytoplasmic molecules directly implicated in these changes, as well as their mutual physical and functional interactions in normal or self-reactive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Particularly, we are interested: i) in those molecules with potential to bind to CD4 or to modify the activity of the kinases involved in T-cell activation; and ii) in the characterization of new cell surface molecules anomalously expressed in self-reactive cells.*

*The cellular, molecular, and immunochemical models to be used can be use-*

lidad tratamos de identificar nuevas moléculas (de superficie celular y citoplásmicas) implicadas en la autorreactividad, y la naturaleza de sus interacciones físicas y funcionales con otras moléculas conocidas. Estamos particularmente interesados en aquellas moléculas con potencial para asociarse a CD4 o para modificar la actividad de quinasas implicadas en la activación, y en la caracterización de nuevas moléculas de superficie celular expresadas anómalamente en células autorreactivas. Todo ello con el objetivo de desarrollar modelos celulares, moleculares, e inmunoquímicos que sean de utilidad en el ensayo de nuevas aproximaciones biológicas y farmacológicas al control de fenómenos de autoinmunidad, y en la comprensión de algunos mecanismos de discriminación propio/ajeno en el Sistema Inmune.

Para lograr este objetivo se llevan a cabo distintas aproximaciones complementarias. En primer lugar, generar mutantes deficientes para la expresión de moléculas, como CD2, CD4 y CD45, que son de importancia en las interacciones célula T-célula presentadora de antígeno (CD2, CD4), asocian tirosina-quinasa (CD2, CD4), modifican la actividad tirosina-quinasa asociada a las señales activadoras (CD45), y están relacionadas física o funcionalmente con el receptor para antígeno.

También nos proponemos caracterizar bioquímica y molecularmente moléculas reconocidas por nuevos anticuerpos monoclonales, seleccionados por unirse a moléculas de superficie expresadas preferentemente en células autorreactivas; por ser potentes inhibidores de la activación a través del receptor para antígeno en linfocitos T CD4<sup>+</sup>; o por reco-

*ful to explore new biological or pharmacological approaches to control autoimmune phenomena, as well as to understand some self/non-self discrimination mechanisms operating in the Immune System.*

*To achieve these aims, we are using different approaches. Firstly, obtaining new mutants for the expression of surface molecules like CD2, CD4, or CD45. These molecules have been selected on the basis of their importance for T cell-antigen presenting cell interactions, their association with tyrosine kinases, their ability to activate kinase activity, or their physical and functional relationship with the T-cell receptor.*

*We are also interested in the biochemical and molecular characterization of molecules recognized by new monoclonal antibodies. These have been selected on the grounds of their recognition of surface molecules preferentially expressed by self-reactive cells; on their inhibitory effect on T-cell receptor activation; or their binding to molecules whose size or expression pattern in cell populations do not coincide with surface polypeptides already described.*

*Thirdly, we are exploring possible differences in the intracellular signals between normal or self-reactive cells. According to our experience in the models already set up, we are interested in possible changes in tyrosine kinase activity upon T-cell receptor ligation, as well as in the analysis of CD4 regions responsible for the association of different molecules which co-precipitate with CD4-lck kinase complexes. Furthermore, other early activation changes initiated by antigen receptor ligands in self-reactive cells*

nocer a moléculas cuyas características de tamaño o expresión en subpoblaciones leucocitarias no se corresponde con las de otras moléculas de superficie ya conocidas.

*will be studied by immunochemical and pharmacological means.*

En tercer lugar, estamos analizando posibles diferencias en las señales intracelulares entre células normales y autorreactivas. De acuerdo con nuestra experiencia anterior en los modelos que hemos desarrollado, estamos interesados en los cambios en la actividad de tirosina quinasa; en estudiar las regiones responsables de la asociación a CD4 de diferentes moléculas que co-precipitan y se asocian de modo diferencial con los complejos CD4/lck kinasa; y en analizar inmunológicamente y farmacológicamente el fenómeno autorreactivo, estudiando los cambios tempranos en distintas vías de activación intracelulares iniciadas por el receptor para antígeno.

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, SAL91-1058 (1991-1994)
- CAM, Plan Regional de Salud C264/91 (1991-1994)
- DGICYT, SAF94-0035 (1994-1997)

#### **Publicaciones / Publications**

- Díaz-Orejas, R., Ballester, S., Feito, M.J., Ronda, M., Ojeda, G., Criado, G., Portolés, P. and Rojo J.M.: Genetic and immunochemical evidence for CD4-dependent association of p56<sup>lck</sup> with the ab T-cell receptor (TCR): Regulation of TCR-induced activation. *EMBO J.* 13, 90-99, 1994.
- Ojeda, G., Portolés, P., del Pozo, M.L., Feito, M.J., Díaz-Orejas, R., Rojo, J.M.: Polyerga, a biological response modifier enhancing T and B lymphocyte-dependent responses. *Res. Exp. Med.* 194, 261-267, 1994.

# Adhesión Celular en el Sistema Inmune

## Cell Adhesion in the Immune System

**ÁNGELES GARCÍA PARDO**

Jefe de Grupo - Investigadora

Group leader - Senior Investigator

**CARMEN DOMÍNGUEZ JIMÉNEZ**

**PALOMA SÁNCHEZ APARICIO**

**JAVIER VALLE MAYOR (I/VIII-1994)**

**JOSÉ VICENTE MOYANO**

(Desde XI-1994)

B. Predoctorales

Graduate Students

**ANA GUTIERREZ VERA**

Personal Técnico

Technical Staff

### Interacciones de leucocitos con matriz extracelular

Las interacciones de leucocitos con la matriz extracelular (MEC) son esenciales para la migración y localización de estas células en tejidos así como para su función. Nuestro grupo está interesado en el estudio de la regulación y consecuencias biológicas de la adhesión de leucocitos a fibronectina, un componente mayoritario de la MEC. La adhesión de estas células a fibronectina se produce a través de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 1$  que reconocen las regiones central (sitio RGD) o carboxilo-terminal (sitio CS-1 y dominio Hep II) de la fibronectina respectivamente. Hemos mostrado que la integrina  $\alpha 4\beta 1$  existe en múltiples estados de activación entre las células hematopoyéticas, que se diferencian por la capacidad para reconocer los varios ligandos en fibronectina. Se puede inducir la activación de  $\alpha 4\beta 1$  por un anticuerpo monoclonal anti- $\beta 1$ ; esta activación conlleva un cambio conformacional que resulta en una forma del receptor con alta afinidad. Recientemente hemos demostrado que la activación de  $\alpha 4\beta 1$  también afecta su especificidad ya que, en estado activado,  $\alpha 4\beta 1$  reconoce el sitio RGD de fibronectina. Dado que  $\alpha 4\beta 1$  es por tanto un receptor flexible capaz de reconocer diferentes ligandos según su estado de activación, actualmente estamos estudiando las consecuencias biológicas de la interacción con los varios sitios de fibronectina. Hemos visto que existe una reorganización de citoesqueleto y un patrón de fosforilación de proteínas en tirosina distintos dependiendo del ligando al que se une la integrina  $\alpha 4\beta 1$ . Nuestros planes futuros incluyen el es-

### Leukocyte interactions with extracellular matrix

*Leukocyte interactions with the extracellular matrix (ECM) are essential to their migration and localization in tissues as well as to their function. Our group is studying the regulation and biological consequences of leukocyte adhesion to fibronectin, a major component of the ECM. Adhesion of these cells to fibronectin is mediated by the  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 1$  integrins which recognize the central (RGD site) or carboxy-terminal (CS-1 site and Hep II domain) regions of fibronectin respectively. We have shown that  $\alpha 4\beta 1$  is present in multiple states of activation among different hemopoietic cells, which differ in the ability to recognize the various fibronectin ligands. Activation of  $\alpha 4\beta 1$  is induced by a mAb directed to the  $\beta 1$  subunit, and involves a conformational change which results in a high affinity form of the receptor. Recently we have shown that activation of  $\alpha 4\beta 1$  also affects its ligand specificity since activated  $\alpha 4\beta 1$  is able to recognize the RGD site, a novel ligand for this integrin. Because  $\alpha 4\beta 1$  is therefore a flexible receptor able to bind different ligands according to the activation state, we are currently studying the biological consequences of interaction with the various sites in fibronectin. We have found a different cytoskeleton reorganization and protein tyrosine phosphorylation depending on the ligand to which  $\alpha 4\beta 1$  binds. Our future plans include the study of other intracellular consequences in response to attachment to the various active sites in fibronectin.*



tudio de otros efectos intracelulares que se produzcan como consecuencia de la adhesión a los varios sitios activos de fibronectina.

### **Interacción de leucocitos con endotelio**

Los leucocitos salen del torrente sanguíneo y llegan a los tejidos pertinentes migrando a través de la pared endotelial. Este proceso, esencial para una buena vigilancia inmunológica, está mediado por varias moléculas de adhesión como las integrinas, selectinas, y otros ligandos que se expresan en células endoteliales activadas. Las células endoteliales también sintetizan y depositan fibronectina en la matriz subendotelial y en la superficie celular. Nosotros estamos estudiando el papel de esta fibronectina en la etapa inicial de salida y en la posterior migración de los leucocitos a través del endotelio. Para ello, estamos determinando las isoformas de fibronectina que sintetiza el endotelio normal y el efecto de varias citoquinas y otros agentes activadores sobre el patrón de síntesis de estas isoformas. Este modelo de activación de células endoteliales refleja la situación que se produce *in vivo* en un proceso inflamatorio por ejemplo. Estamos produciendo y caracterizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra secuencias de fibronectina que están reguladas por *splicing* alternativo y por tanto, sólo presentes en ciertas isoformas. Dado que estos sitios median adhesión celular, su presencia o ausencia puede ser importante en la regulación de los mecanismos de adhesión que tienen lugar durante la recirculación y migración de leucocitos.

### **Leukocyte interactions with endothelium**

*Leukocytes leave the blood and enter appropriate tissues by migrating through the endothelial layer. This essential step for a good immunological surveillance is mediated by several adhesion molecules including integrins, selectins, and other endothelial cell ligands which are expressed upon activation. Endothelial cells also synthesize and deposit fibronectin on the subendothelial matrix and on the cell surface. We are studying the role of this fibronectin in the initial exit and further migration of leukocytes through endothelium. Our approach is to determine which fibronectin isoforms are synthesized by normal endothelium and if this pattern is altered by cytokines and other agents known to activate endothelial cells, a situation that occurs in vivo. We are developing mAbs directed to specific sequences which are regulated by alternative splicing mechanisms and therefore only present on certain isoforms. Because these sites support cell adhesion their presence or absence may be important in the regulation of adhesion mechanisms that take place during leukocyte circulation and migration.*

**Tesis Doctorales / Doctoral Theses**

- Paloma Sánchez Aparicio. Interacción de leucocitos humanos con la proteína de matriz extracelular fibronectina. Regulación y función de la integrina  $\alpha 4\beta 1$ . Universidad Complutense de Madrid, 1994. Directora: A. García Pardo

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CICYT, SAL 91-0785 (1991-1994)
- CAM, 133/92 (1993-1994)
- UE, Programa Biomed, BMH1-CT92-0376 (1992-1995)
- CICYT, SAF94-0117 (1994-1997)
- CAM, AE00063/94 (1994-1995)
- FISS, 94/0277 (1994-1997)

**Publicaciones / Publications**

- Arroyo, A.G., García-Pardo, A. and Sánchez-Madrid, F.: A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti- $\beta 1$  chain mAb. *J. Biol. Chem.* 268, 9863-9868, 1993.
- García-Pardo, A. and Gold, L.I.: Further characterization of the binding of fibronectin to gelatin reveals the presence of different binding interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 181-188, 1993.
- Sánchez-Aparicio, P., Ferreira, O.C. and García-Pardo, A.:  $\alpha 4\beta 1$  recognition of the Hep II domain of fibronectin is constitutive on some hemopoietic cells but requires activation on others. *J. Immunol.* 150, 3506-3514, 1993.
- Erle, D.J., Briskin, M.J., Butcher, E.C., García-Pardo, A., Lazarovits, A.I. and Tidswell, M.: Expression and function of the MadCAM-1 receptor, integrin  $\alpha 4\beta 7$ , on human leukocytes. *J. Immunol.* 153, 517-528, 1994.
- Sánchez-Aparicio, P., Domínguez-Jiménez, C. and García-Pardo, A.: Activation of the  $\alpha 4\beta 1$  integrin through the  $\beta 1$  subunit induces recognition of the RGDS sequence in fibronectin. *J. Cell Biol.* 126, 271-279, 1994.

# Biología Celular de las Moléculas de Adhesión

## Cell Biology of Adhesion Molecules

**JOAQUÍN TEIXIDÓ** (DESDE X-1993)  
Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**M.<sup>a</sup> LUISA MUÑOZ** (DESDE X-1993)  
**M.<sup>a</sup> MAR ROBLEDO** (1994)  
**ANDRÉS HIDALGO** (DESDE IX-1994)  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

### Identificación de dominios funcionales en la subunidad $\alpha 4$ de la integrina VLA-4.

VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) es una molécula de adhesión de la familia de las integrinas que participa tanto en adhesiones célula-matriz extracelular como en interacciones célula-célula. VLA-4 se expresa en células hematopoyéticas (a excepción de neutrófilos, plaquetas y eritrocitos), en melanoma, y en determinados estadios de diferenciación muscular. Hasta la fecha se han identificado tres ligandos para VLA-4: fibronectina, VCAM-1 y trombospondina. VLA-4 es una molécula central en procesos inflamatorios normales, pero juega asimismo un papel importante en enfermedades asociadas a procesos inflamatorios, como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, y en alergia. Por otra parte, la expresión de VLA-4 en células de melanoma, pero no en melanocitos, ha llevado a sugerir que dicha integrina puede estar involucrada en el desarrollo de este tipo de tumores.

Con el fin de identificar dominios en la subunidad  $\alpha 4$  que participan en la interacción con ligandos de VLA-4, estamos modificando determinados residuos en  $\alpha 4$  mediante mutagénesis dirigida en el cDNA de  $\alpha 4$ . El efecto de las mutaciones introducidas en la función de VLA-4 se analizará mediante ensayos de adhesión de células transfectadas con las distintas mutaciones. Estos estudios permitirán conocer a nivel molecular las interacciones de VLA-4 con sus ligandos, lo cual contribuirá a una mejor comprensión de los procesos en los que participa VLA-4.

### Identification of functional domains in the $\alpha 4$ subunit of the integrin VLA-4.

VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) is an adhesion molecule from the integrin family which is involved in both cell-extracellular matrix and cell-cell adhesions. VLA-4 is expressed on most hematopoietic cells (except neutrophils, platelets and erythrocytes), in melanoma, and in several stages during muscle differentiation. Thus far, three ligands for VLA-4 have been identified: fibronectin, VCAM-1 and thrombospondin. VLA-4 is a central molecule during both normal and pathologic inflammatory processes, including rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and allergy. Also, expression of VLA-4 by melanoma, but not melanocytes, could contribute to the development of the tumour.

To identify domains on the  $\alpha 4$  subunit which are involved in VLA-4 interaction with its ligands, we are modifying selected residues on  $\alpha 4$  by site-directed mutagenesis of the  $\alpha 4$  cDNA. The effects of the mutations in VLA-4 function will be analyzed by cell adhesion assays using transfected cells containing the selected mutations on  $\alpha 4$ . These studies will show at a molecular level the interactions of VLA-4 with its ligands and will contribute to a better understanding of the processes involving VLA-4.

### Characterization of cell adhesions in bone marrow.

The bone marrow contains a heterogeneous mixture of stromal cells which form niches where the proliferation and differentiation of stem cells takes place.

### **Caracterización de adhesiones celulares en médula ósea**

La médula ósea está constituida por una mezcla heterogénea de células estromales que forman microambientes inductores de la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas. La importancia funcional de las células estromales durante la hematopoyesis ha sido demostrada experimentalmente en cultivos a largo término entre células estromales adherentes y precursoras mieloides o linfoides. La proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos en estos cultivos es absolutamente dependiente de su interacción con las células estromales.

La identificación y caracterización de las estructuras moleculares de la superficie de las células estromales responsables de la interacción con las células progenitoras hematopoyéticas, es de vital importancia para una mejor comprensión de los fenómenos de adhesión celular que afectan el proceso de la hematopoyesis. Un procedimiento adecuado para analizar el papel de moléculas de adhesión de células estromales durante la hematopoyesis consiste en la utilización de cultivos a largo término de líneas celulares establecidas de estroma de médula ósea con células progenitoras en presencia de anticuerpos monoclonales que reconocen moléculas de adhesión de estroma. Mediante este procedimiento se han identificado previamente varias moléculas de adhesión con importancia funcional durante la hematopoyesis. El presente estudio tiene como objetivo la identificación y caracterización de moléculas de adhesión expresadas por células estromales que participen en la interacción con células progenitoras multipo-

*the functional relevance of stromal cells has been experimentally demonstrated in long term cultures between these stromal cells and myeloid and lymphoid progenitor cells. The proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors requires a close contact with the stromal cells. The identification and characterization of the stromal cell surface molecular structures responsible of the interaction with the progenitor cells will contribute to a better understanding of the cell adhesion events which affect the hematopoiesis.*

*An optimal approach to analyze the role of stromal cell adhesion molecules during hematopoiesis consists in the use of long term cultures using stromal cell lines and progenitor cells in the presence of monoclonal antibodies against adhesion molecules from stromal cell surfaces. This method has been used before to identify several cell adhesion molecules with functional relevance during hematopoiesis. The goal of the present study is the identification and characterization of adhesion molecules expressed by bone marrow stromal cells which are involved in the interaction with progenitor cells. These analyses will be carried out using monoclonal antibodies generated against bone marrow stromal cell lines. This study will help to a better knowledge of the functional relevance of the stromal-progenitor cell interaction in the hematopoiesis.*

tenciales. Estos análisis se llevan a cabo mediante anticuerpos monoclonales generados a partir de líneas celulares de estroma de médula ósea. Este estudio puede aportar un mejor conocimiento de las consecuencias funcionales de las interacciones entre células estromales y progenitores durante el proceso de la hematopoyesis.

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PB92-0494 (1993-1996)
- SmithKline Beecham-CDTI, Código 93150, (1993-1995)
- CAM, AE00040/94, (1995)

#### **Publicaciones / Publications**

- Postigo, A., Teixidó, J. and Sánchez-Madrid, F.: The  $\alpha 4 \beta 1$ /VCAM-1 adhesion pathway in physiology and disease. *Res. Immunol.* 144, 723-735, 1993.
- Teixidó, J. and Sánchez-Madrid, F.: Lymphocyte Adhesion Molecules. *Landes Co.* pp. 54-74, 1993.

# Diferenciación de Linfocitos Humanos

## Receptors Driving Human Lymphocyte Development

---

**ANTONIO DE LA HERA**

Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**ANGELITA REBOLLO-GARCÍA**

(Desde VIII-1994)

**EVA SANZ**

Investigadoras Contratadas  
*Tenure-track Scientists*

**ALFONSO MARTÍN-FONTECHA (1993)**

B. Postdoctoral  
*Postdoctoral Fellow*

**ANA CAMPAL (1994)****GEMMA FERNÁNDEZ-MIGUEL****JAVIER GÓMEZ-GARCÍA**

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

---

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

Parte del trabajo aquí referido se realizó en Proyectos coordinados con el Prof. Álvarez de Mon (UAH), y en colaboración con el Prof. Melchers (Institute for Immunology, Basilea), el Dr. Gaviñondo (CIGB, Habana) y el Dr. Kappes (Fox Chase Cancer Institute, Filadelfia). Se han realizado colaboraciones intramurales con los Grupos de los Drs. Goday (CIB-Biología Celular y del Desarrollo) y Silva (CIB-Inmunología), tal como se recoge en sus Memorias.

El objetivo central de nuestro laboratorio es el estudio de los mecanismos que regulan la proliferación y selección clonal del linaje linfocítico humano, con énfasis en la función de los receptores clonales para antígeno y los factores de crecimiento y diferenciación llamados interleucinas (ILs).

Los receptores clonales de los linfocitos T como B (TCR/CD3, Ig/CD78) requieren el ensamblaje intracelular de múltiples subunidades antes de que el «complejo receptor» sea transportado a la superficie celular y pueda transducir señales.

Sin embargo, los precursores de los linfocitos B expresan en su superficie componentes del receptor antes del reordenamiento correcto de los genes de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de inmunoglobulinas, gracias a la expresión

### Developing tools to analyze receptors driving human lymphocyte differentiation

*This work was partially done as a coordinated Project with Prof. Álvarez de Mon (UAH), and in collaboration with Prof. Melchers (Basel Institute for Immunology), Dr. Gaviñondo (CIGB, Havana) and Dr. Kappes (Fox Chase Cancer Institute, Philadelphia). We also carried out intramural research together with Drs. Goday (Dpt. of Cellular and Developmental Biology-CIB) and Silva (Dpt. of Immunology-CIB), with are well described in their team reports.*

*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 and differentiation factors, termed interleukins (ILs).*

*Both T and B cell receptors (TCR/CD3, Ig/CD78) are compound receptors that require the intracellular assembly of complete sets of subunits prior to their transport to the cell membrane and to become competent for signalling.*

*However, B cell progenitors express on their cell surface Ig-complex components well before the genes for heavy (H) and light (L) Ig chains are functionally rearranged. The expression of Ig surrogate subunits, such as VpreB, allows for that exception. To study the expression of this*

de cadenas substitutivas como VpreB. Para estudiar la distribución y función de esta proteína substitutiva de la cadena ligera ( $\psi$ L) hemos producido y purificado VpreB recombinante, como proteínas de fusión con dominios de inmunoglobulina C $\kappa$  y  $\gamma$ 1. Se ha seleccionado un panel de anticuerpos monoclonales de ratón específicos frente a VpreB humano que reconocen distintos epítomos que se expresan diferencialmente en líneas celulares pro-B y pre-B humanas, y no solamente en células pre-B como hasta ahora. Así, utilizando un monoclonal capaz de detectar VpreB en la superficie de células pro-B, se han podido identificar, aislar y caracterizar los precursores más tempranos de linfocitos B definidos en medula osea humana, reflejando frente a la controversia previa un camino de diferenciación análogo al del ratón.

Nosotros y otros autores hemos postulado la existencia de «módulos de transducción paralela» CD3 $\epsilon\gamma$ , CD3 $\delta$  en los complejos para el antígeno de los linfocitos T (TCR/CD3). Para estudiar esta hipótesis hemos creado y estamos usando ratones transgénicos, hibridomas, transfectantes y proteínas solubles para distintas subunidades CD3; junto con anticuerpos monoclonales. En este momento se está caracterizando un anticuerpo específico para la pareja CD3 $\epsilon\gamma$ , e introduciendo el transgen CD3 $\delta$  humano en ratones que tienen destruido el gen CD3 $\delta$  endógeno (K.O.).

En el área de interleucinas, hemos abordado estudios de ILs bien conocidas, como IL-2, junto a otras recién descubiertas, como IL-13. La producción y purificación de IL-13/C $\kappa$  nos está permitiendo el estudio de nuevas actividades biológicas de IL-13, ensayos de unión y el desa-

*L subrogate protein subunit ( $\psi$ L), we produced and purified recombinant VpreB, like fusion proteins to C $\kappa$  and  $\gamma$ 1 Ig domains. A panel of mouse monoclonal antibodies were created that discriminates distinct epitopes which are available on VpreB as expressed either on pro-B or pre-B cell lines, and not just on pre-B leukemias as occurred before. Using one of the monoclonals, which detects VpreB on pro-B cell surface, the earliest human B cell precursors defined so far have been identified, sorted and characterized. Interestingly, this antibody depicts a B cell differentiation pathway analog to the one found in the mouse model, thus helping to solve former controversies in the field.*

*We have contributed to the emerging concept that T lymphocyte receptors for antigen are composed of parallel transduction units such as CD3 $\epsilon\gamma$  or CD3 $\delta$  chain pairs. Progress in our working model of the TCR/CD3 complex required development of novel reagents. We have created and are using for the purpose tools such as transgenic mice, hybridomas, transfectants and soluble proteins for the different subunits within the complex; together with monoclonal antibodies. We are currently characterizing a monoclonal specific for the CD3 $\epsilon\gamma$  pair, and introducing the human CD3 $\delta$  transgen into a CD3 $\delta$  KO mice background,*

*Within the Interleukin field we addressed issues regarding well defined ones, such as IL-2, together with recently discovered ones, namely IL-13. The in house production and purification of IL-13/C $\kappa$  has allowed us to analyze novel biological properties, develop a ELISA test or perform binding assays without the constraints currently imposed by pharmaceutical operators. Some among the relevant findings*

rollo de un ELISA específico frente a ella salvando las restricciones que actualmente imponen las compañías farmacéuticas al estudio de estos inmunomoduladores. Entre los hallazgos más relevantes merece la pena citarse por su originalidad el potente efecto antitumoral que ejerce IL-13 frente a tumores de células pro- y pre-B humanas y la modulación de la respuesta de células T y NK.

*observed for IL-13/C $\kappa$  are the potent antitumoral effects on acute lymphoblastic leukemia and the modification of T and NK biological responses.*

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CICYT, Plan Nacional I+D, SAL 90/641 (1991-1993)
- CICYT, SAF 93/925-CO2-01 (1994-1996).
- FISS, 94/0026-CO2-02 (1994-1996)
- CAM, Plan Regional de Investigación-Salud, CAM 92/0126 (1992-1994)

#### **Publicaciones / Publications**

- Sanz, E. and de la Hera, A.: Molecular structure of the B-cell antigen receptor complex. *Inflammation*. 3, 40, 1993.
- Campal, A., Sanz, E., Miguel, G.F., de Mon, M.A. and de la Hera, A.: Inside the interleukin maze: the IL-13 clame against redundancy. *Inflammation*. (en prensa, 1994).
- Gómez, J., de la Hera, A., Silva, A., Pitton, C., García, A. and Rebollo, A.: Implication of protein kinase C in IL-2-mediated proliferation and apoptosis in a murine T cell clone. *Exp. Cell Res.* 212, 178, 1994.

#### **Próximos Artículos / Forthcoming Papers**

- Álvarez de Mon, M. and de la Hera, A.: Implicaciones patogénicas del Sistema Inmunitario. En: *Patología General*. (Ed.) McGraw-Hill (en prensa, 1995).
- De la Hera, A. and Álvarez de Mon, M.: Bases celulares y moleculares de la patología del Sistema Inmunitario. En: *Patología General*. (Ed.) McGraw-Hill (en prensa, 1995).
- Gómez, J., Martínez-Aragón, A., Pitton, C., García, A., Silva, A. and Rebollo, A.:  $\zeta$  isoform of protein kinase C controls interleukin-2 mediated proliferation in a murine T cell line. Evidence for an additional role of protein kinase C  $\epsilon$  and  $\beta$ . *Exp. Cell Res.* (en prensa, 1995).
- Sanz, E., Miguel, G.F. and de la Hera, A.: Receptores antigénicos de los linfocitos T y B Scientific American (Ed. Española), (en prensa, 1995).



# Diferenciación Macrofágica y Receptores de Membrana

## *Macrophage Differentiation and Membrane Receptors*

---

**CARMELO BERNABEU QUIRANTE**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**JUAN PEDRO LÓPEZ-BOTE**

**JOSÉ ANTONIO LÓPEZ-GUERRERO**

(Hasta VII-1993)

Investigadores Asociados

*Associate Scientists*

**CARLOS RIUS SOLERA**

(DESDE IX-1993)

B. Postdoctoral

*Postdoctoral Fellow*

**NURIA ALMENDRO MOTOS**

**AINHOA LETAMENDÍA URRACA**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**CARMEN LANGA POZA**

Personal Técnico

*Technical Staff*

---

Endoglina (CD105) y PECAM-1 (CD31) son dos proteínas de membrana presentes en macrófagos y células endoteliales humanos. Durante los últimos dos años, hemos analizado la expresión y función de estas proteínas y en particular su relación con el factor TGF- $\beta$ .

Endoglina es un homodímero de 180kDa capaz de unir TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3, y además presenta una alta homología en los dominios transmembrana y citoplásmico con betaglicano ó receptor tipo III de TGF- $\beta$ . El clonaje de cDNA que codifica para endoglina ha permitido caracterizar dos isoformas distintas de esta proteína (L-endoglina y S-endoglina), las cuales difieren en sus dominios citoplásmicos. Ambas isoformas son capaces de unir el ligando TGF- $\beta$ 1. Endoglina está fosforilada de forma constitutiva principalmente en los residuos de serinas y en menor proporción en treoninas. El nivel de fosforilación de L-endoglina es mucho mayor que el de S-endoglina, lo que está de acuerdo con la composición de sus dominios citoplásmicos. Así, L-endoglina posee 19 residuos serina/treonina, mientras que S-endoglina sólo posee 2. El gen de endoglina ha sido localizado en el cromosoma 9q34qter y mutaciones en dicho gen parecen ser responsables de la enfermedad conocida como telangiectasia hemorrágica hereditaria, lo que sugiere un importante papel para endoglina en la señalización inducida por TGF- $\beta$ . En este sentido, hemos generado una serie de células transfectantes que expresan endoglina para analizar su función.

*Endoglin (CD105) and PECAM-1 (CD31) are two membrane proteins expressed by human macrophages and endothelial cells. During the last two years, we have analysed the expression and function of these proteins and specifically their relationship with the soluble factor TGF- $\beta$ .*

*Endoglin is a homodimer of 180kDa, which is able to bind TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3, and displays a high degree of homology with the type III TGF- $\beta$  receptor (betaglycan) in the transmembrane and cytoplasmic domains. Cloning of the cDNA encoding endoglin allowed the characterization of two distinct isoforms of this protein (L-endoglin and S-endoglin), which differ in their cytoplasmic domains. Both isoforms are able to bind the ligand TGF- $\beta$ 1. Endoglin is constitutively phosphorylated, mainly in serine residues, and to a minor extent in threonines. The level of phosphorylation of L-endoglin is higher than that of S-endoglin, in agreement with the composition of their cytoplasmic domains. Thus, L-endoglin contains 19 serine/threonine residues, whereas S-endoglin has only 2. The gene encoding endoglin has been mapped to human chromosome 9q34qter and mutations in this locus are responsible for the disease hereditary haemorrhagic telangiectasia, which suggests an important role for endoglin in the signaling induced by TGF- $\beta$ . In this sense, we have generated a panel of transfectant cells expressing endoglin to analyse its function.*

*The antigen PECAM-1 is a glycoprotein of 130kDa involved in cellular adhesion phenomena. Since TGF- $\beta$  regula-*

El antígeno PECAM-1 es una glicoproteína de 130kDa implicada en fenómenos de adhesión celular. Dado que TGF- $\beta$  regula diversos procesos de adhesión celular y además es capaz de modular la diferenciación macrofágica, se ha analizado la posible regulación funcional de PECAM-1 por TGF- $\beta$ 1. El tratamiento de la línea promonocítica U-937 con dicho factor induce agregaciones homotípicas simultáneamente con un aumento en la superficie celular de PECAM-1, así como de transcritos específicos. Este fenómeno de adhesión inducido por TGF- $\beta$ 1 parece ser dependiente del antígeno PECAM-1 dado que es inhibido por anticuerpos anti-PECAM-1 y además, células U-937 tratadas con TGF- $\beta$ 1 se unen a fibroblastos de ratón transfectantes que expresan PECAM-1, pero no a transfectantes control. El análisis de la señalización intracelular indica que TGF- $\beta$ 1 induce la actividad protein kinasa C, así como la fosforilación de PECAM-1 y su asociación con el citoesqueleto. Estos resultados demuestran que TGF- $\beta$ 1 regula la función de PECAM-1 incrementando su expresión y activando la adhesión celular mediada por dicha molécula. En este modelo, tanto el aumento de expresión como la fosforilación de PECAM-1 son necesarios en el fenómeno de adhesión, puesto que la inhibición independiente de cada uno de ellos conduce a la inhibición de la agregación celular.

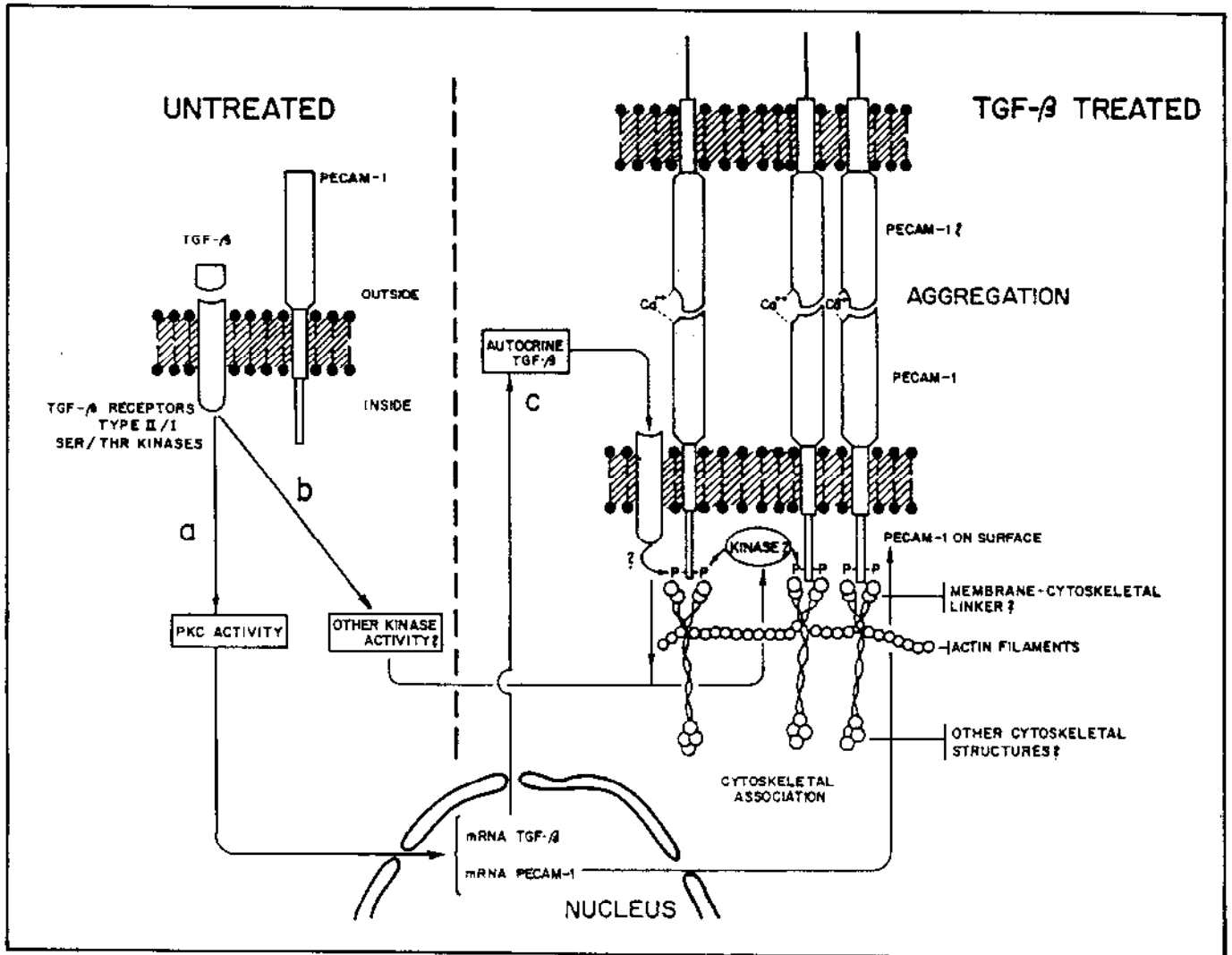
*tes several cell adhesion receptors and is able to modulate the macrophage differentiation, we have analysed the possible functional regulation of PECAM-1 by TGF- $\beta$ 1. Treatment of the promonocytic cell line U-937 with TGF- $\beta$ 1 induces homotypic cellular aggregations, simultaneous with an increase in surface expression and specific transcripts of PECAM-1. The TGF- $\beta$ 1-induced cell adhesion phenomena seems to be directly mediated by PECAM-1 because it is inhibited by anti-PECAM-1 monoclonal antibodies, and TGF- $\beta$ 1-treated U-937 cells bind to PECAM-1-expressing mouse transfectant fibroblasts, but not to mock transfectants. Analysis of the intracellular signaling pathways indicates that TGF- $\beta$ 1 induces protein kinase C activity, as well as PECAM-1 phosphorylation and association with cytoskeletal components. These results provide evidence that TGF- $\beta$ 1 regulates PECAM-1 function by increasing the expression and activating the adhesion of PECAM-1 in monocytic cells. These two mechanisms seem to be necessary for adhesion because independent inhibition of either expression or activation of PECAM-1 leads to abrogation of cellular aggregation.*

#### **Tesis Doctorales / Doctoral Theses**

- Teresa Bellón Heredia. Diferenciación mieloide. Regulación de la expresión de moléculas de adhesión (integrinas y PECAM-1) y clonaje de formas alternativas de endoglina. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 1993. Directores: C. Bernabeu Quirante y A. Corbí López.

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CICYT, SAF94-0791 (1994-1997)
- CICYT, SAL91-0507 (1991-1994)
- CAM, 151/92 (1992)
- CAM, AE00014/94 (1994)



**Publicaciones / Publications**

- Bellón, T., Corbí, A., Lastres, P., Calés, C., Cebrián, M., Vera, S., Cheifetz, S., Massagué, J., Letarte, M. and Bernabeu, C.: Identification and expression of two forms of the human TGF- $\beta$  binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.* 23, 2340-2345, 1993.
- Fernández-Ruiz, E., St-Jacques, S., Bellón, T., Letarte, M. and Bernabeu, C.: Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-qter. *Cytogenet. Cell Genet.* 64, 204-207, 1993.
- López-Bote, J.P., Langa, C., Lastres, P., Rius, C., Marquet, A., Ramos-Ruiz, R. and Bernabeu, C.: Aggregated human immunoglobulins bind to modified proteins. *Scand. J. Immunol.* 37, 593-601, 1993.
- López-Guerrero, J.A., López-Bote, J.P., Ortiz, M.A., Gupta, R.S., Páez, E. and Bernabeu, C.: Modulation of adjuvant arthritis in Lewis rats by recombinant vaccinia virus expressing the human 60-kilodalton heat shock protein. *Infect. Immun.* 61, 4225-4231, 1993.
- Ramos-Ruiz, R., Larraga, V., López-Bote, J.P., Bernabeu, C., Boog, C., Wauben, M. and van Eden, W.: Inhibition of T-cell proliferation by rat synoviocytes. *J. Autoimmun.* 6, 557-569, 1993.
- Bellón, T., Vara, A., Jochems, G., Bernabeu, C. and Corbí, A.: Regulated expression of p150,95 (CD11c/CD18) and VLA-4 (CD49d/CD29) integrins during myeloid differentiation. *Eur. J. Immunol.* 24, 41-47, 1994.
- Lastres, P., Almendro, N., Bellón, T., López-Guerrero, J.A., Eritja, R. and Bernabeu, C.: Functional regulation of PE-CAM-1 by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in promonocytic U-937 cells. *J. Immunol.* 153, 4206-4218, 1994.
- Lastres, P., Martín-Pérez, J., Langa, C. and Bernabeu, C.: Phosphorylation of the human-transforming growth factor- $\beta$ -binding protein endoglin. *Biochem. J.* 301, 765-768, 1994.
- López-Guerrero, J.A., Ortiz, M.A., Páez, E., Bernabeu, C. and López-Bote, J.P.: Therapeutic effect of recombinant vaccinia virus expressing the 60-kilodalton heat shock protein on adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 37, 1462-1418, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Lastres, P., Cebrián, M., Langa, C. and Bernabeu, C.: Modulation by specific mAb of CD31-dependent cellular adhesions. Platelet antigens Section in Schlossman. (Eds.) S. et al, Leukocyte Typing V: White cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, (en prensa, 1995).
- Lastres, P., Langa, C. and Bernabeu, C.: Studies on endoglin transfectants. Endothelial cell antigens Section in Schlossman. (Eds.) S. et al. Leukocyte Typing V: White cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, (en prensa, 1995).

# Epítomos Funcionales de Proteínas de Superficie Celular y Citoesqueleto

## Functional Epitopes of Cell Surface and Cytoskeletal Proteins

**ISABEL BARASOAIN BLASCO**

Jefe de Grupo - Investigadora  
Group leader - Senior Investigator

**PILAR CALVO GALLARDO (1993)**

**CONCEPCIÓN DE INÉS DÍAZ**

B. Predoctorales  
Graduate Students

**TOMÁS HUÉLAMO (Hasta III-1994)**

Asistente Voluntario  
Research Assistant

**Proteínas de la superficie celular de neutrófilos humanos.** Se está realizando un estudio bioquímico y funcional de posibles nuevos antígenos de diferenciación mieloide, empleando un panel de anticuerpos monoclonales frente a neutrófilos. Se determina el efecto de estos anticuerpos sobre la funcionalidad leucocitaria, así como el mecanismo de transducción de señal afectado, y la presencia de los antígenos seleccionados durante la diferenciación mieloide mediante citofluorometría de flujo. Se clonarán, caracterizarán y secuenciarán los genes de los antígenos de mayor interés. Se pretende encontrar nuevos antígenos útiles para la identificación de determinados tipos celulares en procesos patológicos, así como marcadores de los distintos estados de diferenciación mieloide.

**Epítomos funcionales de tubulina.** Con un panel de anticuerpos monoclonales frente a ocho péptidos sintéticos correspondientes a secuencias conservadas de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, se están determinando zonas funcionales de la molécula de tubulina implicadas en la formación de los microtúbulos. Se determina cuáles de los epítomos expuestos en la proteína no ensamblada se ocluyen al formar parte de los microtúbulos, utilizando inmunofluorescencia indirecta de células PtK2 con sus microtúbulos nativos ó fijados, ELISA de microtúbulos ensamblados «in vitro» y mediante inmunomicroscopía electrónica.

**Mecanismos celulares de acción de agentes antitumorales.** Hemos determinado el efecto inhibitorio de un nue-

**Human neutrophil cell surface proteins.** A functional and biochemical search of possible new antigens of myeloid differentiation is being performed, employing a panel of monoclonal antibodies to neutrophils. The effect of these antibodies on leukocyte function is determined, as well as the mechanism of signal transduction which is being affected, and the presence of selected antigens during myeloid differentiation by means of flow cytometry. The genes of the more interesting antigens will be cloned, characterized and sequenced. The aim of this work is to find new antigens useful for the identification of given cell types in pathologic processes, as well as markers of the different states of myeloid differentiation.

**Functional epitopes of tubulin.** Functional surface zones of the tubulin molecule presumably involved in microtubule formation are being determined, employing a panel of monoclonal antibodies to eight synthetic peptides corresponding to conserved sequences of  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin. The epitopes exposed in the non-assembled protein which become occluded in microtubules are detected, using indirect immunofluorescence of PtK2 cell native or fixed cytoskeletons, ELISA of «in vitro» assembled microtubules and electron immune microscopy.

**Cellular mechanisms of action of antitumour agents.** The inhibitory effect of 1-deaza-7,8-dihydropteridine (CI980), a new and potent antitumoral agent and of its chiral isomer NSC 613863 on the «in vitro» polymerization of microtubules has been determined, as well

vo y potente agente antitumoral, 1-deaza-7,8-dihidropteridina (CI980) y de su isómero quiral NSC 613863 sobre la polimerización de microtúbulos «in vitro», así como su acción sobre la red microtubular y la división celular en células PtK2 y leucemias humanas y murinas. Por otra parte, paclitaxel (Taxol) y su análogo semisintético docetaxel son dos compuestos de importancia en la quimioterapia de tumores resistentes que, a diferencia de cualesquiera otros conocidos, promueven efectivamente el ensamblaje de la tubulina y estabilizan los microtúbulos celulares. Hemos estudiado el efecto comparativo de estas dos drogas sobre carcinomas humanos. Se determinará y correlacionará la unión de (3H)-paclitaxel y (14C)-docetaxel a sus dianas en cultivos de celulares, con el grado de polimerización medio de la tubulina celular (ELISA de citoesqueletos), la morfología de la red microtubular (inmunofluorescencia), el bloqueo del ciclo celular (citometría de flujo) y la inducción de apoptosis en las células tratadas.

*as its action on the microtubular network and cell division of PtK2 cells and human and murine leukemias. On the other hand, paclitaxel (Taxol) and its semisynthetic analogue docetaxel are two important compounds in chemotherapy of resistant tumors, which unlike other known compounds promote tubulin assembly and stabilize cellular microtubules. We have comparatively studied the effect of these two drugs on two human carcinomas. We shall determine and correlate the binding of (3H)-paclitaxel and (14C)- docetaxel to their targets in cell cultures, with the degree of average tubulin polymerization (cytoskeleton ELISA), the microtubular network morphology (immunofluorescence), cell cycle inhibition (flow cytometry) and the induction of apoptosis in the treated cells.*

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PM92-0003 (1993-1995)
- DGICYT, PB92-0007 (1993-1995)

#### **Publicaciones / Publications**

- De Inés, C., Leynadier, D., Barasoain, I., Peyrot, V., García, P., Briand, C., Renner, G.A. and Temple Jr. C.: Inhibition of microtubules and cell cycle arrest by a new 1-deaza- 7,8- dihydropteridine antitumor drug, and by its chiral isomer, NSC 613863. *Cancer Res.* 54, 75-84, 1994.
- García, P., Braguer, D., Gérard, C., El Khyari, S., Barra, Y., De Inés, C., Barasoain, I. and Briand, C.: Comparative effects of taxol and Taxotere on two9 different human carcinoma lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34, 335-343, 1994.
- Peyrot, V., Leynadier, D., Sarrazin, M., Briand, C., Barasoain, I., De Inés, C., Andreu, J.M., Temple Jr. G.C. and Renner, G.A.: Interaction of new compounds at microtubular level. *Cellular Pharmacol.* 1, 143-146, 1994.

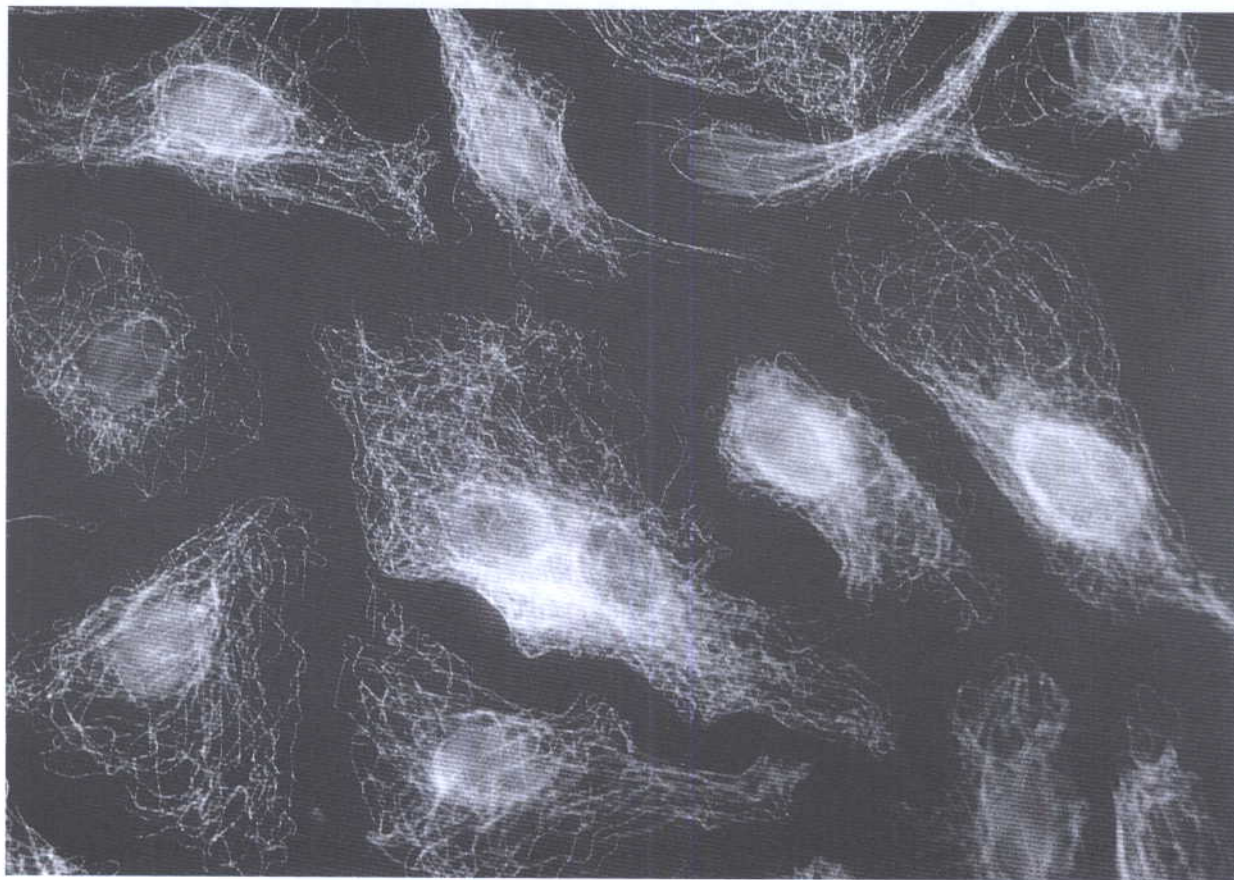


Figura. Microtúbulos de células PtK2 visualizadas con el anticuerpo monoclonal P11E12 específico del extremo N-terminal (posiciones 1-13) de  $\beta$ -tubulina, que ha sido generado con la secuencia MREIVHIQAGQSG.

*Figure. Microtubules of PtK2 cells visualized with P11E12 monoclonal antibody specific of the N-terminal domain (positions 1-13) of  $\beta$ -tubulin, generated with the synthetic sequence MREIVHIQAGQSG.*

# Genética del Complemento

## Complement Genetics Laboratory

---

**SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA**

Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**JAVIER REY CAMPOS**

(HASTA XII-1993)

**PILAR SÁNCHEZ-CORRAL**

Investigadores Contratados  
*Tenure-track Scientists*

**RICARDO RAMOS RUIZ (1993)**

B. Postdoctoral  
*Postdoctoral Fellow*

**NATALIA ARENZANA ARIAS****OLGA CRIADO GARCÍA****FERNANDO PARDO MANUEL  
DE VILLENA**

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**M.<sup>a</sup> 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 protein* (C4BP) and *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) Estudios comparativos y análisis de la evolución molecular del sistema RCA; y iii) Clonaje y secuenciación de una subregión del sistema RCA humano.

*The complement system is a major defense mechanism against the infection by microorganism 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 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. Its 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) Cloning and sequencing of a large region of the RCA gene cluster and iii) Analysis of the molecular evolution of the RCA gene cluster and comparative studies in different mammalian species.*

*Particular emphasis has been given to the analysis of the human complement*



En nuestro laboratorio se está estudiando con particular interés el componente C4BP. Nuestros objetivos aquí incluyen la caracterización de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes *C4BPA* y *C4BPB* y el análisis de las regiones de los polipéptidos C4BP $\alpha$  y C4BP $\beta$  necesarios para la función y peculiar organización estructural de esta importante proteína plasmática. Recientemente hemos iniciado una nueva línea de investigación encaminada a esclarecer la asociación observada en humanos entre elevados niveles de C4BP en plasma y aumento de riesgo a patologías tromboembólicas.

*component C4b-binding protein (C4BP). The interest of the laboratory focuses here in the molecular analysis of the mechanisms controlling the expression of C4BPA and C4BPB genes, and in the characterization of the domains of the C4BP $\alpha$  and C4BP $\beta$  polypeptides that are responsible for the function and peculiar structure of this important human plasma protein. In addition, we have recently open a line of research to clarify the basis for the association found in humans between elevated levels of C4BP in plasma and increased risk to thromboembolic disorders.*

### Tesis Doctorales / Doctoral Thesis

- Fernando Pardo Manuel de Villena. Organización y estructura de los genes del agrupamiento genético RCA. Universidad Complutense de Madrid, 1994. Director: S. Rodríguez de Córdoba

### Organismos Financiadores / Funding Agencies

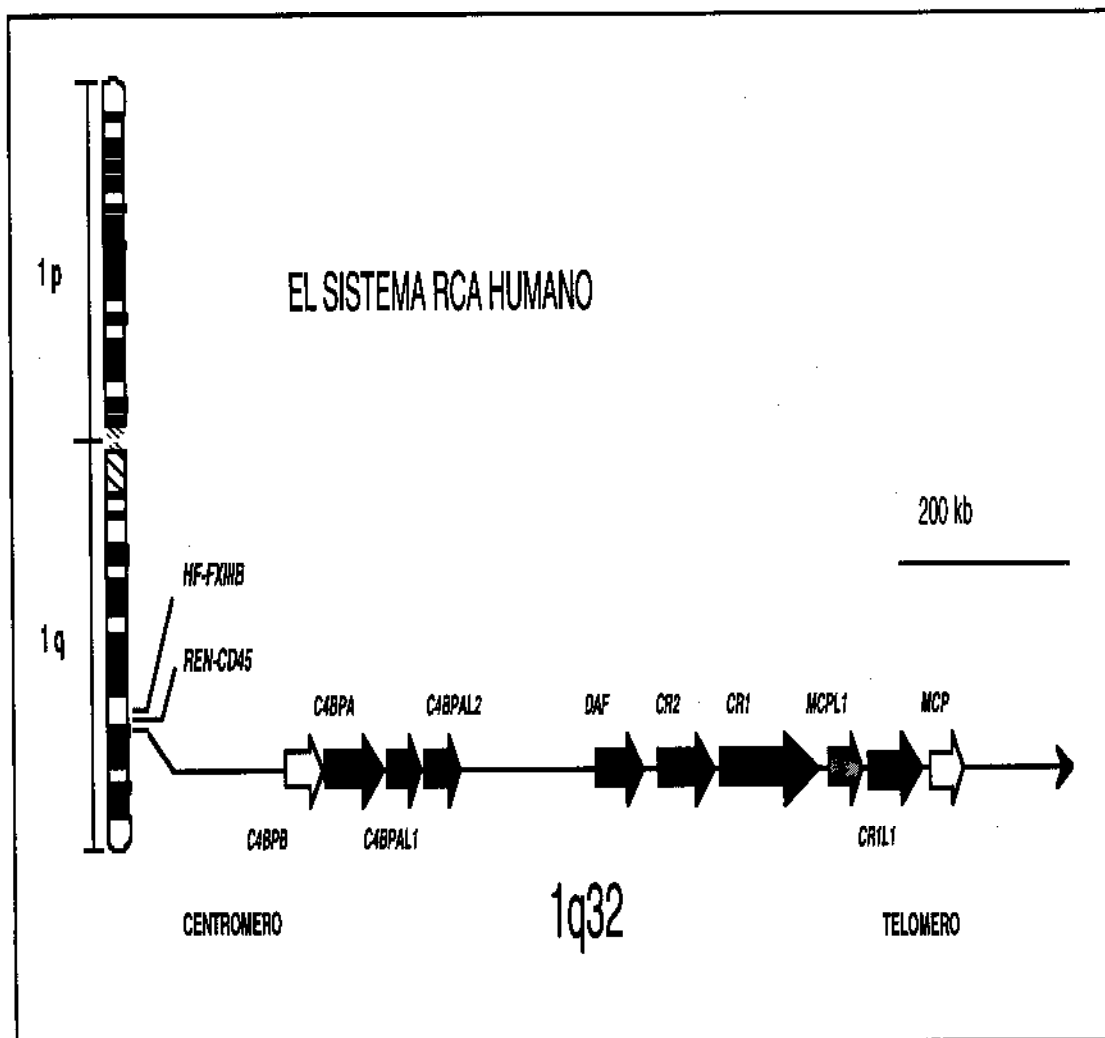
- FIS, (92/0889) (1992-1994)
- CAM, (155/92) (1993-1994)

### Publicaciones / Publications

- Fernández-Ruiz, E., Pardo-Manuel de Villena, F., Rodríguez de Córdoba, S. and Sánchez-Madrid, F.: Regional localization of the human vitronectin receptor alpha subunit to chromosome 2q31-2q32. *Cytogenet. Cell. Genet.* 62, 26-28, 1993.
- González, M.E., Pardo-Manuel de Villena, F., Fernández-Ruiz, E., Rodríguez de Córdoba, S., Lazo, P.A.: The human *CD53* gene, coding for a four transmembrane domain protein, maps to chromosomal region 1p13. *Genomics* 18, 725-728, 1993.
- Hillarp, A., Pardo-Manuel de Villena, F., Ramos-Ruiz, R., Rodríguez de Córdoba, S. and Dahlback, B.: The human C4b-binding protein  $\beta$ -chain gene. *J. Biol. Chem.* 268,15017-15023, 1993.
- Sánchez-Corral, P., Pardo-Manuel de Villena, F., Rey-Campos, J. and Rodríguez de Córdoba, S.: *C4BPAL1*, a member of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster that resulted from the duplication of the gene coding the  $\alpha$ -chain of C4b-binding protein. *Genomics* 17, 185-193, 1993.
- Rodríguez de Córdoba, S., Pérez-Blas, M., Ramos-Ruiz, R., Sánchez-Corral, P., Pardo-Manuel de Villena, F. and Rey-Campos, J.: The gene coding for the  $\beta$ -chain of the complement component C4b-binding protein (*C4BPB*) has become a pseudogene in the mouse. *Genomics* 21, 501-509, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Arenzana, N., Rodríguez de Córdoba, S. and Rey-Campos, J.: The expression of the human gene coding for the  $\alpha$ -chain of C4b-binding protein, *C4BPA*, is controlled by a HNF1-dependent hepatic-specific promoter. *Biochem. J.* (in press, 1995).
- Pardo-Manuel de Villena, F. and Rodríguez de Córdoba, S.: *C4BPAL2*, a second duplication of the *C4BPA* gene in the human RCA gene cluster. *Immunogenetics* (in press, 1995).



# Receptores de Citoquinas

## Cytokine Receptors

**AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**ANGELITA REBOLLO GARCÍA**

(Hasta VIII-1994)

Investigadora Contratada

*Tenure-track Scientist*

**LUIS MARTÍN PARRAS**

**ANA MARTÍNEZ DE ARAGÓN (1994)**

B. Postdoctorales

*Postdoctoral Fellows*

**MÓNICA LAMAS GREGORI**

**FRANCISCO RAMÍREZ (1993)**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**JUANA MARÍA LÓPEZ VERA**

Personal Técnico

*Technical Staff*

En este período nuestro laboratorio trabajó en tres líneas diferentes:

### **1. Efecto de los glucocorticoides sobre la activación mitogénica de linfocitos: Acción del Oxido Nítrico**

Estudios iniciales a nivel molecular, demostraban una regulación positiva de los glucocorticoides sobre el receptor de IL-2. Ahora estudiamos el efecto del glucocorticoide dexametasona sobre la respuesta mitogénica de células de ganglio o bazo *in vitro*.

Los resultados demostraron que existía una gran variabilidad en la respuesta proliferativa de los esplenocitos de diferentes ratas al mitógeno ConA.

Observamos que existía una correlación entre la producción de Oxido Nítrico (NO) y la proliferación celular. Los glucocorticoides inhibían la producción de NO de las células de bazo, permitiendo una mayor proliferación.

Los esplenocitos de rata actuaban de un modo deficiente como células accesorias por su elevada producción de NO. El inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, la N<sup>G</sup>MMA, aumentaba la proliferación en la línea celular OVA-1 antígeno-específica.

### **2. Mecanismos moleculares de la regulación del gen IL-2R $\alpha$ por glucocorticoides.**

Los glucocorticoides regulan la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 en células T. Hemos demostrado la presencia de una Unidad Reguladora de

*During this period our laboratory has been involved in three different lines:*

### **1. Effect of the glucocorticoids on the mitogenic activation of lymphocytes: Role of Nitric Oxide.**

*Preliminary data in our laboratory have shown that glucocorticoids up-regulate the IL-2 receptor expression. Now we carried out the analysis of the effect of the corticoid dexamethasone on the mitogenic response of ConA in spleen and lymphonode cells.*

*Our data showed an important heterogeneity in the proliferative response of rat splenocytes to ConA activation.*

*We observed a strong correlation between the Nitric Oxide (NO) production and cellular proliferation. Therefore, glucocorticoids response of rat splenocytes to ConA activation inhibit NO production by splenocytes, allowing a stronger proliferation.*

*Furthermore, splenocytes are not good feeder cells because of their high NO production. A specific inhibitor of NO synthetase, N<sup>G</sup>MMA, has a positive effect on the proliferation of an antigen-specific OVA-1 T cell line.*

### **2.- Molecular mechanism involved in the regulation of IL-2R $\alpha$ gene by glucocorticoids.**

*Glucocorticoids regulate the cell surface expression of IL-2R $\alpha$  chain on T cells. On the 5'-flanking region of IL2R $\alpha$  gene, we have found a complex Glucocorticoid Regulatory Unit (GRU), located at -1,200*

Glucocorticoides (GRU) que está localizada a -1200 bp del inicio de la transcripción. Esta GRU está formada al menos, por dos elementos que se coordinan entre sí.

Un primer elemento, denominado G1, tiene una fuerte similitud con un medio palíndrome de un GRE (elemento de respuesta a glucocorticoides) y une con baja afinidad un receptor de glucocorticoides parcialmente purificado. Esta región no es suficiente para inducir el gen y requiere la presencia de un segundo elemento, que denominamos G2, y al que se le unen factores transcripcionales no descritos presentes en linfocitos T y en hígado. La combinación de G1+G2 son suficientes para llevar a cabo la inducción del gen de la cadena del IL-2Rec  $\alpha$ , por glucocorticoides.

### 3. Transducción de señales inducidas a través del IL-2Rec.

Varias publicaciones han sugerido el importante papel de la Proteína Kinasa C (PKC) en la transmisión de señales al interior de la célula. Utilizando un sistema celular que responde independientemente a IL-2, IL-4 o IL-9 (TS1 $\beta$ , TS1 $\alpha\beta$ ) y un inhibidor específico de la PKC, GF109203X, demostramos que la PKC está implicada en señalización a través del IL-2Rec. Por el contrario la IL-4 e IL-9 usan vías independientes de PKC para transmitir señales al interior de la célula. Este resultado excluye a la cadena  $\gamma$ , común para los tres receptores, como responsable "per se", de la activación de la PKC. Utilizando oligonucleótidos antisense demostramos que las isoformas de PKC  $\zeta$  y  $\epsilon$  están implicadas en señalización a través del IL-2R de alta afinidad y  $\zeta$  y  $\beta$  a través del de afinidad intermedia. Además la inhibición de la PKC induce a pop-

*bp, from the transcription initiation site. This GRU is, at least, formed by two different elements, which combine together to give rise the dexamethasone response.*

*A first element, named G1, has a strong homology with the -core- of a GRE (Glucocorticoid Responsive Element) which bind a semi-purified glucocorticoid receptor with low affinity. This region G1, is not enough to get a fully induction of IL-2R $\alpha$  gene by glucocorticoids and required a second element, named G2, which binds transcriptional factor presents in lymphocytes and liver, but up to now, any of the most commonly described.*

*Combination of G1+G2 elements is enough to get a fully induction of IL-2R $\alpha$  gen by glucocorticoids.*

### 3. Signal transduction through IL-2Rec.

*Several publications suggest the essential role which plays Protein Kinase C (PKC) on the signal transduction into the cell. Using a cellular system able to respond to three different lymphokines, IL-2, IL-4 or IL-9 (TS1 $\beta$ , TS1 $\alpha\beta$ ) together with an specific inhibitor of PKC activity, GF109203X, we demonstrate that PKC is involved in signaling through IL-2 Rec. On the contrary, IL-4 and IL-9 use signaling pathways independent of PKC. These data exclude the possible role of  $\gamma$  chain, shared by the three IL- receptors, as responsible of the PKC activation. Using antisense oligo-nucleotides we also demonstrate that whereas  $\zeta$  and  $\epsilon$  PKC isoforms are involved in signaling through high affinity IL-2Rec,  $\zeta$  and  $\beta$  are involved in signaling through intermediate affinity.*

tosis en células cultivadas en IL-2, pero no en IL-4 o IL-9.

*Furthermore, PKC inhibition induces the apoptosis on cells cultured in IL-2, but not in IL-4 or IL-9.*

Finalmente, por microscopía confocal hemos observado que la IL-2 induce translocación y asociación de PKC $\zeta$  al citoesqueleto de actina, donde desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto en presencia de IL-2 pero no en presencia de la IL-4.

*Finally, by laser scanning microscopy we observed that IL-2 induces translocation and association of PKC $\zeta$  to the actin cytoskeleton, and plays an essential role in the maintenance of the actin cytoskeleton organization in the presence of IL-2, but not IL-4.*

### Tesis Doctorales / Doctoral Thesis

- Francisco Ramírez Jiménez. Efecto de los glucocorticoides sobre la activación del sistema inmune. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Madrid, 1993. Director: A. Silva.
- Ana Martínez de Aragón Calvo. Actividad inmunológica y toxicidad de las lectinas contenidas en la leguminosa *Phaseolus vulgaris* L. (var. *athropurpurea*), medidas en ratas en crecimiento. Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, 1994. Directores: S. Santidrián y A. Silva.
- Mónica Lamas Gregori. Análisis molecular del mecanismo de regulación de la expresión del gen del IL-2 Receptor  $\alpha$ , por glucocorticoides. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Madrid, 1994. Director: A. Silva.

### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- Fundación R. Areces, (1990-1993)
- CAM, (1991-1993)
- CICYT, SAL91 0275. (1991-1993)
- DGICYT, PB93-1264-C02 (1994-1997)

### Publicaciones / Publications

- Aragón, M.A., Cavalle, C., Tosar, A., Frühbeck, G., Silva, A. and Santidrián, S.: Mitogenicity of isolectins isolated from *Phaseolus vulgaris* L. var. *athropurpurea* in rat spleen lymphocytes. *Food Res. Internat.* 26, 451, 1993.
- Lamas, M., Sanz, E., Martín-Parras, L., Espel, E., Sperisen, P., Collins, M. and Silva, A.: Glucocorticoid hormones upregulate IL-2 Receptor gene expression. *Cell. Immunol.* 151, 437, 1993.
- Rebollo, A. and Silva, A.: Estructura y función del receptor de IL-2. *Inmunología* 13, 39, 1993.
- Rebollo, A. and Silva, A.: Intermediate and high-affinity interleukin 2 receptors expresses in a IL-4-dependent T cell line induce different signals. *Immunology* 80, 229, 1993
- Gómez, J., de la Hera, A., Silva, A., Pitton, C., García, A. and Rebollo, A.: Implications of Protein Kinase C in IL-2 mediated proliferation and apoptosis in a murine T cell clone. *Exp. Cell Research.* 213, 178, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Rebollo, A., Pitton, C., García, A. and Silva, A.: A role for the intermediate affinity IL-2R in the protection against glucocorticoid induced apoptosis. *Immunology*, 84 (en prensa, 1995).
- Rebollo, A., Mérida, I., Gómez, J., Pitton, C., Silva, A., Martínez, C., and García, A.: Differential effect of Rapamycin and Cyclosporin A in proliferation in a murine T cell line expressing either intermediate or high affinity receptor for IL-2. *Cytokine*, 7 (en prensa, 1995).
- Gómez, J., Pitton, C., García, A., Silva, A. and Rebollo, A.:  $\zeta$  Isoform of Protein Kinase C controls Interleukin-2-mediated proliferation in a murine T cell line. *Exp. Cell Research*. (en prensa, 1995).

# Transducción de Señales y Biología Leucocitaria

## *Leukocyte Biology and Signal Transduction*

---

### **FAUSTINO MOLLINEDO**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

### **DOLORES PÉREZ-SALA**

Investigadora Contratada

*Tenure-track Scientist*

**ALICIA EGUINO** (HASTA III-1994)

### **IGNACIO FLORES**

### **CONSUELO GAJATE**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

### **ROSA MARTÍNEZ-DALMAU**

Personal Técnico

*Technical Staff*

***Este Grupo se ha trasladado  
a la Facultad de Medicina  
de la Universidad de  
Valladolid, en Julio de 1994***

---

Las principales líneas de trabajo que actualmente se están llevando a cabo en el laboratorio incluyen:

- Análisis de los mecanismos moleculares implicados en la diferenciación y apoptosis de células mieloides humanas: mecanismos de acción de agentes antileucémicos, papel de proto-oncogenes y factores transcripcionales.
- Caracterización y clonaje de nuevos antígenos leucocitarios implicados en la funcionalidad de neutrófilos humanos.
- Análisis de los mecanismos que regulan la translocación a la superficie celular de un gránulo secretor enriquecido en gelatinasa en neutrófilos humanos, y estudio del papel de la movilización de dicho gránulo en la funcionalidad del neutrófilo y en diapedesis.
- Caracterización y clonaje de una fosfolipasa D implicada en la transducción de señal de leucocitos, y estudio de su papel en la activación celular.

*The current research lines in the laboratory include:*

- *Analysis of the molecular mechanisms involved in the differentiation and apoptosis of human myeloid cells: action mechanisms of antileukemic agents, role of proto-oncogenes and transcription factors.*
- *Characterization and cloning of novel leukocyte antigens involved in neutrophil functions.*
- *Analysis of the mechanisms regulating the translocation to the cell surface of a gelatinase-rich secretory granule in human neutrophils, and study of its role in neutrophil functionality and diapedesis.*
- *Characterization and cloning of a phospholipase D involved in leukocyte signalling and its role in cell activation.*

### **Tesis Doctorales / Doctoral Thesis**

- Alicia Eguinoa López de Uralde. Mecanismos de acción post-receptor de TNF- $\alpha$  y GM-CSF en células mieloides humanas. Universidad Complutense de Madrid (Facultad de Farmacia), 1993. Director: F. Mollinedo.

### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CAM, C181/91 (1991-1993)
- DGICYT, PM92-0003 (1992-1994)
- DGICYT, PB92-0077 (1993-1995)

**Publicaciones / Publications**

- Corey, S., Eguinoa, A., Puyana-Theall, K., Bolen, J.B., Cantley, L., Mollinedo, F., Jackson, T.R., Hawkins, P.T. and Stephens, L.R.: Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor activates PtdIns 3OH-kinase via *src*-related tyrosine kinase(s) in human myeloid-derived cells. *EMBO J.* 12, 2681-2690, 1993.
- Mollinedo, F., Gajate, C., Tugores, A., Flores, I. and Naranjo, J.R.: Differences in expression of transcription factor AP-1 in human promyelocytic HL-60 cells during differentiation towards macrophages versus granulocytes. *Biochem. J.* 294, 137-144, 1993.
- Mollinedo, F., Martínez-Dalmau, R. and Modolell, M.: Early and selective induction of apoptosis in human leukemic cells by the alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH<sub>3</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 603-609, 1993.
- Mollinedo, F., Pérez-Sala, D., Gajate, C., Jiménez, B., Rodríguez, P. and Lacal, J.C.: Localization of rap1 and rap2 proteins in the gelatinase-containing granules of human neutrophils. *FEBS Lett.* 326, 209-214, 1993.
- Collado-Escobar, D. and Mollinedo, F.: Dexamethasone modifies the functional responses of the granulocytic differentiating HL-60 cells. *Biochem. J.* 299, 553-559, 1994.
- Mollinedo, F., Gajate, C. and Flores, I.: Involvement of phospholipase D in the activation of transcription factor AP-1 in human T lymphoid Jurkat cells. *J. Immunol.* 153, 2457-2469, 1994.
- Mollinedo, F., Gajate, C. and Modolell, M.: The ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine induces expression of *fos* and *jun* proto-oncogenes and activates AP-1 transcription factor in human leukaemic cells. *Biochem. J.* 302, 325-329, 1994.
- Pérez-Sala, D. and Mollinedo, F.: Inhibition of isoprenoid biosynthesis induces apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1209-1215, 1994.
- Roldán, E.R.S., Martínez-Dalmau, R. and Mollinedo, F.: Diacylglycerol and alkylacylglycerol stimulate ram sperm phospholipase A<sub>2</sub>. *Int. J. Biochem.* 26, 951-958, 1994.



# Virología Molecular

## Molecular Virology

**EDUARDO PÁEZ ABRIL**

Jefe de Grupo

*Group leader*

**CARMEN GIL FERNÁNDEZ**

(Jubilada VIII-1994)

Investigadora

*Senior Investigator*

**M.<sup>a</sup> DEL CARMEN SANCHO MOLINA**

B. Predoctoral

*Graduate Student*

**FRANCISCO GARCÍA TABARES**

**BÁRBARA MORENO JIMÉNEZ (1994)**

**M.<sup>a</sup> LUISA RODRÍGUEZ MUÑOZ**

(1993)

Personal Técnico

*Technical Staff*

### **Desarrollo de nuevos vectores de expresión recombinantes basados en el virus *vaccinia*: Aplicación en inmunología vírica y vacunas**

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 variedad 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

### ***Safer and improved recombinant vaccine expression vectors based on vaccinia virus: Applications in viral immunology and vaccine development***

*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 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 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.*

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.

Se están obteniendo también virus recombinantes que expresan proteínas heterólogas posiblemente implicadas en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y tumorales. Se ha analizado la modificación de la respuesta inmune frente a estas proteínas y su capacidad terapéutica. Estos virus recombinantes, además de su aportación al conocimiento del mecanismo molecular de la respuesta inmune, permiten augurar nuevas vías en el tratamiento de estas importantes enfermedades.

*We have also obtained recombinant viruses expressing heterologous proteins which are most likely involved in autoimmune and tumoral disease development. We have analyzed in vivo the immune response and its therapeutic ability. These recombinant viruses may be considered as valuable tools toward deciphering the molecular mechanism of the immune response and they provided new avenues of therapeutic intervention in these important diseases.*

#### **Científicos Invitados / Visiting Scientists**

– José Antonio López Guerrero, Lab. Diferenciación Macrofágica, Dpto. Inmunología, CIB.

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

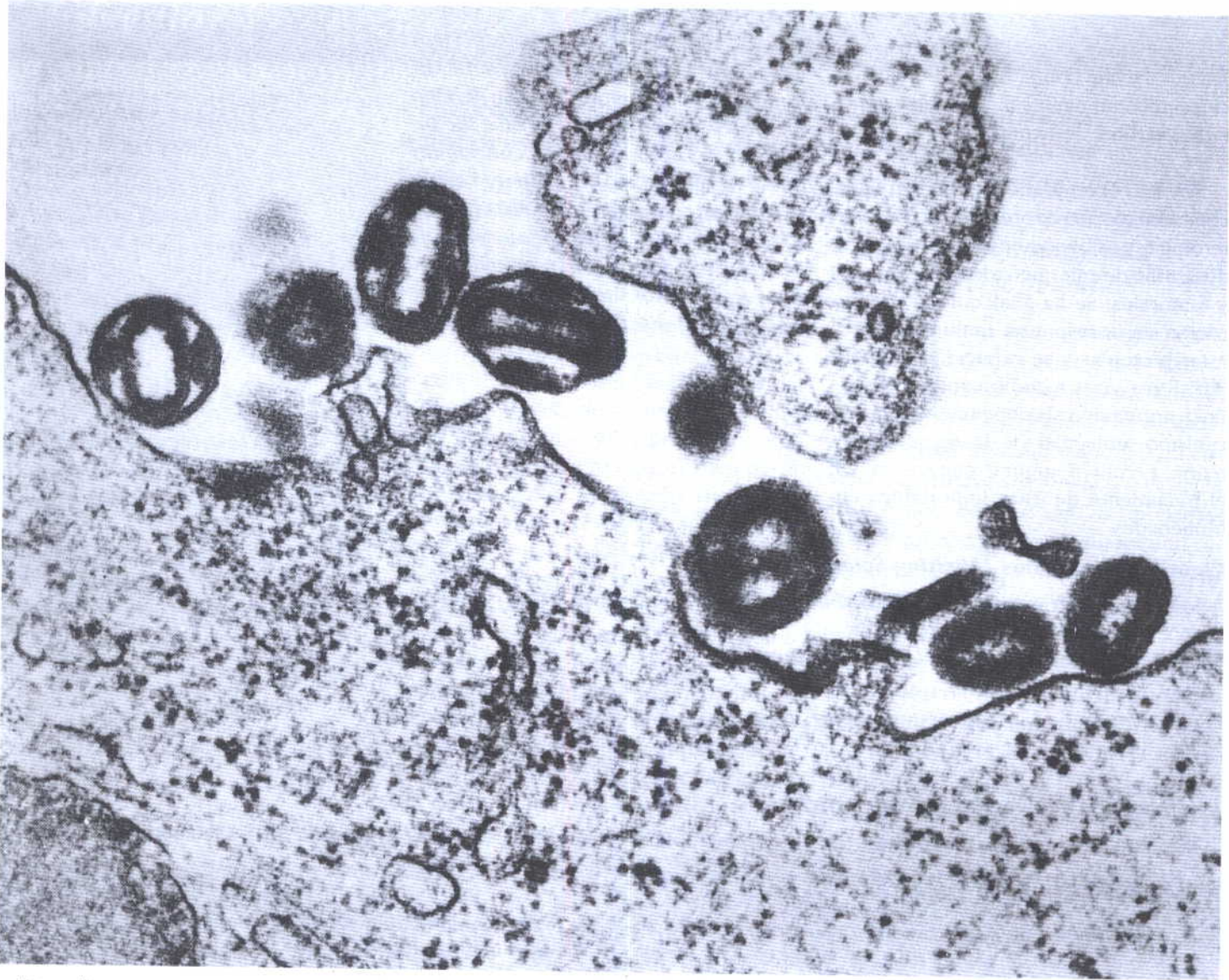
- CICYT, BIO91-0602, (1991-1994)
- CEE, HCM Program, ERB4050PL930462, (1993-1996)
- CICYT, BIO94-0118, (1994-1997)

#### **Artículos de Divulgación / Press Articles**

– Páez, E., Domingo, E., Díaz Ruiz, J.R. y Fernández, R.: El resurgir de los virus. Diario EL PAIS (Sección Futuro), 1993.

#### **Publicaciones / Publications**

- García-Villalón, D., Gil-Fernández, C. and De Clercq, E.: Activity of several S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors against African swine fever virus replication in Vero cells. *Antiviral Res.* 20, 131-144, 1993.
- López-Guerrero, J.A., López-Bote, J.P., Ortiz, M.A., Gupta, R.S., Páez, E. and Bernabeu, C.: Recombinant *vaccinia* virus for human heat-shock protein 60 prevents adjuvant arthritis. *Infect. Immun.* 61, 4225-4231, 1993.
- Ortiz, M.A., de Carlos, A. and Páez, E.: *Poxvirus*: El resurgir de un clásico de la virología. *Virología* 1, 2-13, 1993.
- Páez, E.: Una nueva generación de vacunas. *Virología* 1, 59-60, 1993.
- López-Guerrero, J.A., Ortiz, M.A., Páez, E., Bernabeu, C. and López-Bote, J.P.: Therapeutic effect of the recombinant *vaccinia* virus expressing the 60-kilodalton heat shock protein on adjuvant arthritis. *Arthr. Rheum.* 37, 1462-1467, 1994.
- Ortiz, M.A. and Páez, E.: Identification of viral membrane proteins required for cell fusion and viral dissemination that are modified during *vaccinia* virus persistence. *Virology* 198, 155-168, 1994.



Fotografía:

Virus vaccinia defectivos en diseminación vírica. En la foto se ilustra un grupo de partículas en el momento previo a la entrada en la célula. Una vez dentro, estos viriones se multiplicarán y formarán una progenie que no será capaz de salir de la célula quedando atrapados en su interior.

*Vaccinia virus defective in viral spreading. The photograph illustrates a group of particles in the moment previous to entry in the cell. Once inside, these virions will multiply and form a progenie that will not exit the cell remaining trapped within.*

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
**DEPARTMENT OF MOLECULAR MICROBIOLOGY**

---

Jefe de Departamento  
*Department Head*

**ERNESTO GARCÍA LÓPEZ**

Investigadores / *Scientists*  
Profesores de Investigación:

**ERNESTO GARCÍA LÓPEZ**  
**RUBENS LÓPEZ GARCÍA**

Investigadores Científicos:

**RAMÓN DÍAZ OREJAS**  
**JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ**  
**CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA**  
**JUAN ANTONIO LEAL OJEDA**  
**ANGEL T. MARTÍNEZ FERRER**  
**MONIQUE NOVAES-LEDIEU**  
**MIGUEL ANGEL PEÑALVA SOTO**  
**FUENSANTA REYES RAMÍREZ**  
**CONCEPCIÓN RONDA LAÍN**  
**GERTRUDIS DE TORRONTÉGUI**  
**M.<sup>a</sup> DEL PILAR VILAS MINONDO**

Colaboradores Científicos:

**M.<sup>a</sup> ELENA FERNÁNDEZ-TRESGUERRES**  
**PEDRO A. GARCÍA GONZÁLEZ**  
**ALDO GONZÁLEZ BECERRA**  
**M.<sup>a</sup> DEL CARMEN GUTIÉRREZ RUEDA**  
**VICTOR DE LORENZO PRIETO**  
**MARÍA JESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ**

Titulados Superiores Especializados:

**SARA ISABEL PÉREZ PRIETO**  
**SYLVIA RODRÍGUEZ SAINT-JEAN**

Secretaria

**M.<sup>a</sup> VICTORIA LAFITA TOGORES**

---

# Biodegradación de la Lignina

## *Lignin Biodegradation*

**ÁNGEL T. MARTÍNEZ FERRER**

Jefe de Grupo  
*Group leader*

**MARÍA JESÚS MARTÍNEZ**

Investigadores  
*Senior Investigators*

**JOSÉ MARÍA BARRASA**

Investigador Asociado  
*Associate Scientist*

**FRANCISCO GUILLÉN CARRETERO**

Investigador Contratado  
*Tenure-track Scientist*

**MARÍA JOSÉ MARTÍNEZ**

B. Postdoctoral  
*Postdoctoral Fellow*

**SUSANA CAMARERO**

**LUCILIA CAMELO (1994)**

**ANA GUTIÉRREZ**

**CARMEN MUÑOZ**

**ELISA VARELA**

**FRANCISCO JAVIER RUIZ (1994)**

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**ANGELINES GUJJARRO**

**TERESA RAPOSO**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

**1) Deslignificación biológica en la fabricación del papel: Optimización de mezclas de enzimas para el tratamiento de paja de cereales y otros materiales no leñosos.**

El objetivo del proyecto es optimizar tratamientos enzimáticos para la deslignificación de la paja de cereales - a través de una aproximación interdisciplinar que tendrá en cuenta las peculiaridades de las gramíneas tanto en lo relativo a la anatomía de los tejidos como a la estructura química de los polímeros de la pared celular - a fin de proporcionar una solución biotecnológica (incrementando la productividad por la mejora en el secado del papel, y la disminución de la lignina en los efluentes) a alguno de los principales inconvenientes del uso de la paja para la producción de pasta de papel, y reducir simultáneamente los costes de la energía y los productos químicos utilizados en la fabricación de la pasta de papel, que serán combinados con métodos biológicos.

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

Varias especies del género *Pleurotus* causan degradación selectiva de la lignina y pueden ser utilizadas en procesos de deslignificación. Ya que no se ha podido detectar actividad lignina peroxidasa (LiP) en estos hongos, la presencia de LiP se está estudiando utilizando anticuerpos, y la existencia de los correspondientes genes por hibridación del DNA de *Pleurotus* con una sonda pre-

**1) Biological delignification in paper manufacture: Optimization of enzyme mixtures for treating cereal straw and other non-woody materials.**

The objective of the project is to optimize enzymatic treatments for straw delignification - through an interdisciplinary approach that will take into account gramineous peculiarities both in tissue anatomy and chemical structure of cell wall polymers - in order to provide a biotechnological solution (increasing productivity by improved dewatering, and decreasing lignin in effluents) to some of the main drawbacks of straw for pulp production, and to reduce simultaneously the costs of energy and chemicals used in pulp manufacture that will be combined with biological means.

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

Several species from the genus *Pleurotus* cause selective degradation of lignin and could be used for biological delignification. Due to lignin peroxidase (LiP) activity cannot be observed in these fungi, the presence of LiP is being investigated using antibodies, and the existence of the corresponding gene is being examined by DNA hybridization with a probe prepared with PCR from the sequence reported for the *Phanerochaete chrysosporium* LiP-H8 gene. The AAO detected in several *Pleurotus* species, can represent the suitable source for the  $H_2O_2$  required in lignin degradation. The exis-

parada por PCR a partir de la secuencia del gen de la LiP-H8 de *Phanerochaete chrysosporium*. La AAO detectada en diferentes especies de *Pleurotus* puede representar la fuente de  $H_2O_2$  extracelular necesario para la degradación de la lignina. En este sentido, se investiga la existencia de un sistema cíclico de producción de  $H_2O_2$  en el que participan la AAO y reductasas intracelulares. Se ha preparado un oligonucleótido sintético a partir de la secuencia del amino-terminal de la AAO y, por PCR, un polinucleótido utilizando como iniciadores el oligonucleótido obtenido del amino-terminal y el complementario correspondiente a una secuencia interna de la proteína (amino-terminal de un péptido obtenido tras digestión con tripsina). Estas sondas se utilizan para buscar el gen de la AAO en otros basidiomicetos utilizando análisis de hibridación con DNA (Southern blot).

### **3) Revalorización de la paja mediante la fabricación de pasta, papel y materiales poliméricos.**

El objetivo del proyecto es la utilización industrial de la paja de cereales para la producción de pastas de alto rendimiento, papel, fibras poliméricas, películas y aglomerados. Todos estos productos se fabricarán utilizando tecnologías alternativas, y los problemas ambientales relacionados con el uso de la paja serán analizados. Dentro de este estudio, se investiga la decoloración biológica de los efluentes del pulpeo de la paja, con objeto de eliminar uno de los principales inconvenientes del uso de esta materia prima para la fabricación de pasta de papel.

### **4) Biopulpeo y bioblanqueo.**

Este proyecto busca una alternativa biológica a los procesos actuales de pulpeo

*of a cyclic system for  $H_2O_2$  production, including AAO and intracellular reductases, is being investigated in Pleurotus. Synthetic oligonucleotides from the amino-terminal sequence of purified AAO are being prepared, and a DNA probe obtained by PCR, using as primers the amino-terminal oligonucleotide and an oligonucleotide from an internal sequence (amino-terminal of a peptide after trypsin digestion). These are being used as hybridization probes in Southern blot analyses for the screening of the AAO gene in different basidiomycetes.*

### **3) Upgrading straw into pulp, paper and polymeric materials.**

*The objective of the project is the industrial utilization 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, and environmental problems associated with the industrial use of straw is being tackled during the project. Biological decolorization of straw pulping effluents, to solve one of the main drawbacks for the use of straw in paper pulp manufacture, are being investigated.*

### **4) 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 lignin peroxidases. The specific objectives of the project are: a) To isolate and characterize new organisms useful for lignin bio-degradation; 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;*

y blanqueo químicos, mediante el uso de organismos que producen lignina peroxidadas. Los objetivos específicos del proyecto son: a) aislar y caracterizar nuevos organismos de interés para la biodegradación de la lignina; b) aislar los genes de las ligninasas y estudiar organismos hospedadores compatibles para su clonación; c) Clonar y expresar los genes en uno de los hospedadores y comparar la capacidad de las cepas recombinantes con las salvajes; d) Comparar sistemas de generación in situ de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de tipo enzimático y no-enzimático; y e) Optimizar reactores para el uso de los nuevos sistemas biológicos, y evaluar el proceso integrado de biopulpeo/bio-blanqueo.

*d) To compare in situ non-enzymatic and enzymatic peroxide producing systems; and e) To optimize the reactor design for the new biological systems, and to evaluate the integrate biopulping/bioleaching process.*

#### **Tesinas de Licenciatura y Tesis Doctorales / Master and Doctoral Thests**

- Lucilia Caramelo. Synthesis of aromatic compounds and presence of related enzymatic activities in cultures of ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. Universidad de Lisboa, 1992. T. de Licenciatura. Director: A.T. Martínez.
- Teresa María Alconada Magliano. Enzimas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* involucradas en la pared celular de plantas superiores. Universidad de Buenos Aires, 1992. Tesis Doctoral. Directores: M.<sup>a</sup> J. Martínez (CIB, CSIC) y M.A. Galvagno (Dpto. de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires)

#### **Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- María Natividad Blanco. Profesora Titular, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología de la Universidad de Alcalá de Henares (1993).

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- ECLAIR-EU, AGRE-44 (1991-1995)
- ECLAIR-EU, AGRE-47 (1990-1995)
- PLANICYT-Biotecnología, BIO91-1218-C03-CE (1991-1994)
- PLANICYT-Biotecnología, BIO92-357 (1992-1995)
- PLANICYT-Biotecnología (red temática «Biodegradación Lignina y Hemicelulosa») (1993-1994)
- AIR-EU, AIR2-CT93-1219 (1994-1996)

**Publicaciones / Publications**

- Bechtold, R., González, A.E., Almendros, G., Martínez, M.J. and Martínez, A.T.: Lignin alteration by *Ganoderma australe* and other white-rot fungi after solid-state fermentation of beech wood. *Holzforschung* 47, 91-96, 1993.
- Fidalgo, M.L., Terrón, M.C., Martínez, A.T., González, A.E., González-Vila, F.J. and Galletti, G.C.: Comparative study of fractions from alkaline extraction of wheat straw through chemical degradation, analytical pyrolysis, and spectroscopic techniques. *J. Agr. Food Chem.* 41, 1621-1626, 1993.
- Guillén, F., Martínez, A.T. and Martínez, M.J.: Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 209, 603-611, 1993.
- Pérez, V., de Troya, M.T., Martínez, A.T., González-Vila, F.J., Arias, E. and González, A.E.: *In vitro* decay of *Aextoxicon punctatum* and *Fagus sylvatica* woods by white and brown-rot fungi. *Wood Sci. Technol.* 27, 295-307, 1993.
- Vázquez, C., Patiño, B. and Martínez, M.J.: Purification and characterization of an exopolysaccharonase produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. *FEMS Microbiol. Lett.* 110, 191-196, 1993.
- Vázquez, C., Reyes, F. and Martínez, M.J.: Comparative study of pectic activities from different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 210-213, 1993.
- Alconada, T.M. and Martínez, M.J.: Purification and characterization of an extracellular endo-1,4-xylanase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 305-310, 1994.
- Camarero, S., Galletti, G.C. and Martínez, A.T.: Preferential degradation of phenolic lignin-units by two white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4509-4516, 1994.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. and Veness, R.G.: Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 235-240, 1994.
- Guillén, F. and Evans, C.S.: Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2811-2817, 1994.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. and Evans, C.S.: Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 465-470, 1994.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. and Martínez, A.T.: Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1783-1788, 1994.
- Martínez, A.T., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Ruel, K. and Pelayo, M.: Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 265-274, 1994.
- Martínez, M.J., Muñoz, C., Guillén, F. and Martínez, A.T.: Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 500-504, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Barrasa, J.M., Camarero, S., Martínez, A.T. and Ruel, K.: Ultrastructural aspects of wheat straw solid-state fermentation by *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press, 1995).
- Peláez, F., Martínez, M.J. and Martínez, A.T.: Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.* 99, 37-42, 1995.



# Bioquímica de Hongos

## Biochemistry of Fungi

**CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA**

**MONIQUE NOVAES-LEDIEU**

(Desde IX-1994 Investigadora  
Asociada)

Jefes de Grupo - Investigadoras  
*Group leaders - Senior Investigators*

**AMELIA PÉREZ CABO**

Investigadora Asociada  
*Associate Scientist*

**MYRIAM CALONJE MACAYA**

**JUAN IGNACIO CORUJO MARTÍNEZ**

(Hasta X-1994)

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**NATALIE BOURNE MARTÍN**

(Hasta IX-1994)

B. Pregraduado  
*Undergraduate Student*

**ELOY BLANCO MARCOS**

**ANTONIA CONDE VICED**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

La pared celular de *Agaricus bisporus*, hongo basidiomiceto superior cultivado para el consumo humano, constituye un excelente modelo para estudios estructurales y quimiotaxonómicos. En este sentido se han aislado, purificado y caracterizado químicamente (cromatografía de gases-espectroscopía de masas de los derivados permetilados) los polisacáridos de dicha pared en diferentes variedades comerciales del citado organismo así como en micelios monocarióticos aislados previamente en el laboratorio y sus correspondientes micelios dicarióticos. Nuestro abordaje experimental se dirige a:

1) Análisis de ciertos polisacáridos de la pared celular como marcadores bioquímicos específicos para la posterior protección legal de aquellas cepas con interés comercial.

2) Diferencias características entre polisacáridos de la pared de los monocariontes y sus correspondientes dicariontes.

3) Relación entre la presencia/ausencia de determinados polisacáridos de pared y el grado de resistencia a la infección por *Verticillium fungicola*, enfermedad importante de los cultivos industriales de *Agaricus bisporus*.

*The cell wall of Agaricus bisporus, a higher fungus cultivated for human nutrition, constitutes an excellent model for structural and chemotaxonomic studies. For this purpose wall polysaccharides from different commercial varieties as well as from monokaryotic mycelia previously prepared in the laboratory and their corresponding dikaryotic mycelia have been isolated, purified and chemically characterized (gas-liquid chromatography-mass spectroscopy). Our experimental approach involves:*

1) *Analysis of certain wall polysaccharides as specific biochemical markers for the further legal protection of those strains with commercial interest.*

2) *Characteristic differences between wall polysaccharides of monokaryons and their corresponding dikaryons.*

3) *Relationship between presence-absence of determined wall polysaccharides and their degree of resistance to the Verticillium fungicola infection, a frequent disease of industrial Agaricus bisporus cultures.*

**Tesina de Licenciatura / Master Thesis**

- Myriam Calonje Macaya. Caracterización de cepas de *Agaricus bisporus* en base a la arquitectura molecular de la pared celular y a la variabilidad isoenzimática. Universidad Complutense de Madrid, 1994. Directores: C. García Mendoza y M. Novaes-Ledieu.

**Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Prof. J. Labarère y Dras. B. Iraçabal y C. Ducos. Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Amélioration des Champignons Cultivés INRA-Université de Bordeaux II.
- Dres. J. Pardo y F. Gea Alegría. Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñon (CIES). Quintanar del Rey, Cuenca.

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PB 910054 (1992-93)
- DGICYT, PB 920001 (1993-95)
- Acciones integradas Hispano-Francesas, (HF 113 y HF 175) (1993-94)
- CM-Consejo Regional de Aquitania (Conferencia de las Regiones de Europa del Atlántico Sur) 271/92 (1993)
- Comunidad Castilla-La Mancha, (Coordinado CIB-CIES) 95/CH-31 (1993-96)

**Publicaciones / Publications**

- Sánchez Hernández, M.E. , García Mendoza, C. and Novaes-Ledieu, M.: Two different alkali-soluble  $\alpha$ -glucans in hyphal walls of the basidiomycete *Armillaria mellea*. *Microbiología SEM* 9, 34-42, 1993.
- Calonje, M., García Mendoza, C., Pérez Cabo, A. and Novaes-Ledieu, M.: Some significant differences in wall chemistry among four commercial *Agaricus bisporus* strains. *Current Microbiol.* 29, 1-5, 1994.
- García Mendoza, C., Corujo, J.I., Blanco, E. and Novaes-Ledieu, M.: Ultraestructura de las paredes celulares de basidiocarpos de *Agaricus bisporus* (champiñon común). *Rev. Centro Invest. ULSA* 1, 125-132, 1994.

# ***Birnavirus, Lyssavirus y Aeromonas Patógenos en Acuicultura*** ***Birnavirus, Lyssavirus and Aeromonas Aquaculture Pathogenes***

**M.<sup>a</sup> DEL PILAR VILAS MINONDO**

Jefe de Grupo  
*Group leader*

**M.<sup>a</sup> DEL CARMEN GUTIÉRREZ RUEDA**

**SARA ISABEL PÉREZ PRIETO**  
**SYLVIA RODRÍGUEZ SAINT-JEAN**  
Investigadoras  
*Senior Investigators*

**MARTA ALONSO FERNÁNDEZ**

(Desde IX-1994)

**JAIME ESTEBAN ALONSO**

(X a XII-1993)

**M.<sup>a</sup> ÁNGEL PALACIOS FONTCUBERTA**

(1994)

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**M.<sup>a</sup> LUISA RODRÍGUEZ MUÑOZ**

(1993)

**M.<sup>a</sup> MERCEDES SÁNCHEZ CARMONA**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

Los dos microorganismos responsables de las mayores pérdidas económicas en la acuicultura continental española son **1)** el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), un Birnavirus serotípicamente heterogéneo con dos serogrupos y nueve serotipos que muestran virulencias distintas. **2)** la bacteria *Aeromonas salmonicida* que es el agente etiológico de la enfermedad denominada furunculosis. Ambos patógenos producen portadores y problemas en cuanto a medidas de prevención y control. Aún no existen antivíricos ni vacunas comerciales para el IPNV y las vacunas disponibles para *A. salmonicida* no siempre producen niveles altos de protección; además preocupan las descripciones recientes de resistencia a antibióticos.

Nosotros hemos centrado nuestros estudios durante el último período en dos aspectos relacionados con ambos patógenos:

**I. Análisis de algunos factores y su influencia sobre la virulencia y el estado de portador.**

**II. Estudio del estado de portador mediante nuevas técnicas.**

Hemos estudiado la cinética de infección del IPNV determinando la infectividad y la presencia de antígenos virales en monociclos líticos y en sucesivos pases de células persistentemente infectadas y hemos demostrado que el establecimiento del estado persistente es inducido por la producción de partículas defectivas y no por interferón. También hemos finalizado la caracterización

*Two microorganisms are responsible for the greatest economic impact on the Spanish culture of salmonids: the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), a Birnavirus serotypically heterogenous, with two major serogroups and nine serotypes which show different virulences, and Aeromonas salmonicida bacteria, the etiological agent of fish furunculosis. Both pathogens cause permanent carrier states and problems for preventional control measures. There are no known antiviral compounds either commercial vaccines for IPNV and the available vaccines for A. salmonicida do not always give high levels of protection. Moreover, antibiotic resistance is increasing.*

*We have focused our studies during the last two year period on two main subjects, related to both pathogens:*

***I. Analysis of some factors influencing virulence and carrier states.***

***II. Application of new techniques for the carrier state study.***

*We have studied the kinetic of IPNV infection by determining the infectivity and viral antigen presence in a one-step infective cycle and 20 passages of persistently infected cells. We have demonstrated that the establishment of persistence is induced by defective viral particle production and not by interferon. We have also finished the serological characterization of Spanish IPNV strains that were obtained by us in previous work. Virulence and serotyping of our 94 isolates and their prevalence and situation in river basins*

serológica de IPNV españoles que fueron obtenidos en estudios previos. La virulencia y serotipado de 94 cepas y su localización por cuencas hidrográficas será un información relevante en el caso de comercialización de vacunas y cuando deban evitarse mezclas de serotipos de distintas virulencia.

Actualmente hemos iniciado la caracterización molecular de las cepas españolas de virus IPN comparando las proteínas estructurales del virus y el estudio del gen que codifica la proteína inductora de anticuerpos neutralizantes (VP2).

En *A. salmonicida* se evaluaron los efectos de condiciones ambientales distintas en la supervivencia del patógeno y la sensibilidad a antibióticos de cepas españolas, encontrándose resistencias frente a 12 antibióticos empleados usualmente como medicamentos. Esta información es útil porque en la U.E. se está evitando el uso indiscriminado de fármacos y es una preocupación el impacto de las prácticas de acuicultura en el entorno.

Hemos demostrado la viabilidad de la inmunofluorescencia indirecta cuantificada por citometría de flujo para detectar antígenos virales en células espermáticas y leucocitos. Estos no son células diana en la replicación del IPNV pero si son células óptimas para el diagnóstico de portadores. Con esta tecnología es posible estudiar de forma incruenta la evolución del estado de portador en una población de reproductores. También hemos utilizado la tecnología PCR para la detección simultánea de *Birnavirus* y *Rhabdovirus* en muestras problema, optimizando la técnica para su aplicación a los 3 tipos de virus de interés en la U.E.

*is relevant information available for predicting the efficacy of a hypothetical vaccine and when the mixing of serotypes should be avoided.*

*We are actually involved in molecular characterization of IPNV strains to compare the structural viral proteins and to study the gene encoding VP2 protein, responsible for inducing protective immunity in fish.*

*In respect to A. salmonicida we have evaluated the effects of different environmental conditions on the survival of the pathogen and the sensitivity to antibiotics of Spanish strains. We found resistance to 12 antibiotics usually used as medicine. The information is useful because the existance of growing concern in European Union about the impact of aquacultural practices on the environment and the indiscriminated use of drugs.*

*We have been able to use the indirect immunofluorescence stain by flow cytometry to detect and quantify viral antigens in both sperm cells and leucocytes. The latter are not the target cells for IPNV replication but we concluded they are optime to define or diagnose the carrier state. With this technology it is possible to incruently study the evolution of virus persistence in a fish population. We have also used the technology RT-PCR for the simultaneous detection of Birnavirus and Rhabdovirus in problem samples and we have optimized the method for the 3 principal viruses affecting salmonid fish in the U.S.A. and Europe.*

*Recently we have also become interested in salmonid rhabdovirus because we have succeeded in isolating one, serolo-*

Actualmente estamos interesados también en rhabdovirus de salmónidos ya que hemos aislado un virus serológicamente relacionado con el principal causante de pérdidas económicas en USA, siendo nuestra descripción la primera en España. Nos proponemos el estudio de la patogénesis molecular de coinfecciones *Birnavirus-Rhabdovirus*.

*gically related to the virus described in the U.S.A. as the greatest and most serious pathogen for their aquaculture, our report being the first in Spain and we intend to study the molecular pathogenesis of Birnavirus-Rhabdovirus dual infections.*

### **Tesis Doctorales / Doctoral Thesis**

- Sylvia Patricia Rodríguez Saint-Jean. Aislamiento y Caracterización de Virus de Salmónidos: Estudio de Factores que Influyen en el Proceso Infeccioso y su Prevención. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1993. Directora: S.I. Pérez Prieto.

### **Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Carmen de la Rosa Jorje. Universidad Complutense de Madrid. (Año sabático desde IX-1994).

### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CICYT, MAR91-0365 (1991-1994)
- CAM, C229/91 (1991-1994)
- Contrato con la empresa SEAMASA (1993)
- Contrato con la empresa SMS Zootecnia (1993)

### **Publicaciones / Publications**

- Rodríguez Saint-Jean, S., Pérez Prieto, S.I. y Vilas Minondo, M.<sup>a</sup> P.: Flow cytometric analysis of necrosis pancreatic virus attachment to fish sperm. *Dis. Aquat. Org.* vol. 15, 153-156, 1993.
- Rodríguez, S., Vilas, P. and Pérez, S.: A viral diagnostic survey of Spanish rainbow trout farms. I. Sensitivity of four cell lines to wild IPNV isolates. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* vol. 13 (4), 119-122, 1993.
- Rodríguez, S., Pérez, S. and Vilas, P.: A viral diagnostic survey of Spanish rainbow trout farms. II. IPNV serotypes. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* vol. 13 (5), 146-149, 1993.
- Pérez, S.I., Rodríguez, S. and Vilas, P.: Flow Cytometry in Fish Virology. In: *Techniques In Fish Immunology*. (Ed.) J.S. Stolen, SOS Publications, pp. 161-173. 1994. Fair Haven, NJ 07760 U.S.A.
- Rodríguez, S., Vilas, M.<sup>a</sup> P. and Pérez, S.I.: Prevalence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Salmonid Fish Farmed in Spain. *J. Aquat. A. Health* 6 (2), 138-143, 1994.
- Vilas M.<sup>a</sup> P., Rodríguez S. and Pérez, S.I.: A case of coinfection of IPN and IHN virus in farmed rainbow trout in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14 (2), 47-50, 1994.

### **Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Vilas, P., Gutiérrez, C., Pérez, S., Rodríguez, S.: Actividad antivírica de distintas especies de *Pseudomonas*. *Scientia Marina* (en prensa, 1995).

---

**JUAN ANTONIO LEAL OJEDA**  
Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**M.<sup>a</sup> BEGOÑA GÓMEZ MIRANDA**  
B. Postdoctoral  
*Postdoctoral Fellow*

**JEZABEL DOMENECH MANTECA**  
B. Predoctoral  
*Graduate Student*

**JESÚS LÓPEZ RAMÍREZ**  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

---

En nuestro laboratorio se han descubierto polisacáridos de la pared celular de los hongos que una vez extraídos con NaOH 1 M son solubles en agua. Con pocas excepciones, estos polisacáridos son característicos de grupos de hongos que taxonómicamente pueden descender al nivel de género o subgénero, y por ello es posible descubrir tantos polisacáridos nuevos como géneros o subgéneros de hongos se han descrito.

#### **Caracterización de polisacáridos**

Se obtiene la fracción soluble en álcali y en agua (FIS) de las paredes celulares. Se purifica el polisacárido más abundante de esta fracción utilizando precipitación o solubilización selectiva, cromatografía en columna, etc. dependiendo de las características físico-químicas de cada polisacárido. Posteriormente, se determina su composición química, tipo de enlaces y la estructura de la unidad repetitiva (cromatografía de gases, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, etc.).

Estas investigaciones además de su aportación al conocimiento de la pared celular de los hongos y a química de polisacáridos, permiten utilizar estas sustancias como:

**a)** Marcadores quimiotaxonómicos para agrupar las especies en grupos naturales a nivel de género o subgénero ayudando a otras técnicas: morfología, estudios genéticos, isoenzimas, etc. También permite relacionar los estados imperfectos de los hongos con sus estados perfectos.

*Polysaccharides alkali-extractable and water-soluble have been isolated from fungal cell walls. These polysaccharides with few exceptions, are characteristic of fungal groups at the level of genus or subgenus, therefore it should be possible to characterize as many new polysaccharides as genus or subgenus of fungi have been described.*

#### **Characterization of the polysaccharides**

*The alkali- and water-soluble fraction (FIS) is obtained from fungal cell walls. The main polysaccharide from this fraction is purified by selective precipitation or solubilization, column chromatography, etc. according to the physico-chemical properties of each polysaccharide. The chemical composition, linkage types and structure of the repeating unit, are determined by gas chromatography, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, etc.*

*This work, in addition to its contribution to the knowledge of the fungal cell-wall and to the chemistry of polysaccharides, allows the use of these substances as:*

**a)** *Chemotaxonomic markers for the arrangement of species in natural groups at the genus or subgenus level in connection with other techniques: morphology, genetical studies, isoenzymes, etc. They also allow to relate the imperfect states of the fungi to their perfect states.*

**b)** *Substrates for the characterization of new enzymatic activities of fungi or other microorganisms.*

b) Sustratos enzimáticos para la caracterización de nuevas actividades enzimáticas de los hongos u otros microorganismos.

c) Antígenos para la obtención de anticuerpos que permitirían la localización de estos polisacáridos en la pared y la rápida caracterización de los hongos que pertenecen a un mismo grupo. Las pequeñas diferencias químicas y estructurales de los polisacáridos de algunos grupos de hongos, que sistemáticamente están muy próximas, permitiría estudiar el efecto de las variaciones en la estructura de estas moléculas en la producción de anticuerpos o en su actividad.

c) *Antigens for the obtainment of antibodies for the localization of these polysaccharides on the cell wall and a rapid characterization of the fungi of the same group. The slight chemical and structural differences found in the polysaccharides of certain groups of fungi, which are related, would allow to study the effect of changes of these molecules in the production and activity of the antibodies.*

#### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- DGICYT, PB91-0054 (1992-1993)
- DGICYT, PB92-0001 (1993-1996)

#### Publicaciones / Publications

- Guarro, J., Cano, J., Leal, J.A., Gómez-Miranda, B. and Bernabé, M.: Composition of the cell wall polysaccharides in some geophilic dermatophytes. *Mycopathologia* 122, 69-77, 1993.
- Jiménez-Barbero, J., Bernabé, M., Leal, J.A., Prieto, A. and Gómez-Miranda, B.: Chemical structure and conformational features of cell-wall polysaccharides isolated from *Aphanoascus mephitatus* and related species. *Carbohydrate Res.* 250, 289-299, 1993.
- Leal, J.A., Gómez-Miranda, B., Prieto, A. and Bernabé, M.: Differences in cell wall polysaccharides of several species of *Eupenicillium*. *FEMS Microb. Lett.* 108, 341-346, 1993.
- Leal, J.A., Prieto, A., Gómez-Miranda, B., Jiménez-Barbero, J. and Bernabé, M.: Structure and conformational features of an alkali- and water-soluble galactofuranan from the cell walls of *E. crustaceum*. *Carbohydrate Res.* 244, 361-368, 1993.
- Domenech, J., Prieto, A., Bernabé, M. and Leal, J.A.: Cell wall polysaccharides of our strains of *Paecilomyces variotii*. *Curr. Microbiol.* 28, 169-173, 1994.
- Parra, E., Jiménez-Barbero, J., Bernabé, M., Leal, J.A., Prieto, A. and Gómez-Miranda, B.: Structural studies of fungal cell-wall polysaccharides from two strains of *Talaromyces flavus*. *Carbohydrate Res.* 251, 315-325, 1994.
- Parra, E., Jiménez-Barbero, J., Bernabé, M., Leal, J.A., Prieto, A. and Gómez-Miranda, B.: Structural investigation of two cell-wall polysaccharides of *Penicillium expansum*. *Carbohydrate Res.* 257, 239-248, 1994.

- Prieto, A., Bernabé, M. and Leal, J.A.: Isolation, purification and chemical characterization of alkali-extractable polysaccharides from the cell walls of *Talaromyces species*. *Mycol. Res.* 96, 1994.
- Santamaría, F., Nuevo, O.M., Alfonso, C., Prieto, A., Leal, J.A. and Reyes, F.: Biochemical studies on the cell wall degradation of *Fusarium oxisporum f. sp. lycopersici* race 2 by lytic enzymes from Mucorales for its control. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 152-155, 1994.

#### **Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Jiménez-Barbero, J., Prieto, A., Gómez-Miranda, B., Leal, J.A. and Bernabé, M.: Chemical structure of fungal cell-wall polysaccharides isolated from *Microsporium gypseum* and related species of *Microsporium* and *Trychophyton*. *Carbohydrate Res.* (in press, 1995).
- Leal, J.A.: Taxonomic applications of polysaccharides. In: *Chemical Fungal Taxonomy*. (Eds.) Frisvad, J.C., Bridge, P.D. and Arora, D.K. Handbook in Applied Mycology Vol. 6, Marcel Dekker, Inc. N.Y./ Basel/Hong Kong. (in press, 1995).
- Leal, J.A.: Water-soluble polysaccharide of fungal cell walls. In: *Micro-organisms in Ruminant Nutrition* (Prins, R .A. and Stewart, C.S., Eds.) Nottingham University Press. Nottingham. (in press, 1995).



# Fisiología y Bioquímica de Hongos Filamentosos

## *Physiology and Biochemistry of Filamentous Fungus*

**FUENSANTA REYES RAMÍREZ**

Jefe de Grupo - Investigadora  
*Group leader - Senior Investigator*

**FRANCISCO SANTAMARÍA PÉREZ**

Investigador Asociado  
*Associate Scientist*

**RAUL GARCÍA LEPE**

**M.<sup>a</sup> CARMEN LAHOZ BELTRÁ**

(Hasta IV-994)

**OSCAR MARIANO NUERO GARCÍA**

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**CARMELINA RODRÍGUEZ MUÑOZ**

Personal Técnico  
*Technical Staff*

**1) Fisiología y bioquímica del proceso degradativo de hongos filamentosos.** Se ha purificado y caracterizado una quitín desacetilasa de *Aspergillus nidulans* implicada en la degradación de la quitina de la pared celular de este hongo en su proceso degradativo. Asimismo en este hongo se han purificado y caracterizado tres  $\beta$ -1,3-glucanasas que llevan a cabo la degradación de los  $\beta$ -1,3-glucanos de su pared celular.

**2) Estudios sobre el control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 (Fol2) por otros hongos.** Por fraccionamiento de las paredes celulares de *Fol2* se aisló y caracterizó un polisacárido complejo, un betagluco-galacto-manano resistente a la lisis química y enzimática que posiblemente confiere resistencia a la pared celular de este hongo. Se han estudiado la degradación de las paredes celulares de *Fol2* así como de las diferentes fracciones obtenidas de la pared por enzimas líticas de diferentes Mucorales, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. El betagluco-galacto-manano se hidrolizó por enzimas líticas de *Fusarium moniliforme*, con producción de glucosa, galactosa y manosa, siendo este último el azúcar mayoritario.

En la actualidad se está estudiando este complejo enzimático con el objeto de planificar el control biológico de *Fol2* por otros hongos o por sus enzimas líticas convenientemente inmovilizadas.

**3) Aprovechamiento de residuos industriales. Lipasas de *Penicillium chrysogenum*.** Se han separado y caracterizado dos lipasas en los residuos in-

**1) *Phytsiology and biochemistry of the degradative process of filamentous fungi.*** A chitin deacetylase and three  $\beta$ -1,3-glucanases from *Aspergillus nidulans* have been purified and characterized. These enzymes are involved in the degradation of chitin and  $\beta$ -1,3-glucan of cell wall respectively during the degradative process of this fungus.

**2) *Studies on the biological control of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* race 2 (Fol2) by other fungi.** From cell wall of *Fol2* were separated and characterized differente fractions, one of them was characterized as a complex polysaccharide, a betagluco-galacto-mannan very resistant to chemical or enzymatic lysis and which can give resistance to the cell wall lysis of this fungus. The degradation of cell wall and cell wall fractions of *Fol2* with lytic enzymes from fungi of the genera *Mucorales*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* has been carried out. The betagluco-galacto-mannan was hydrolyzed with lytic enzymes from *Fusarium moniliforme* with production of glucose galactose and mannose, being the mannose the main sugar present in the hydrolyzate. At present, these lytic enzymes are being studied, the object of this work is to plan the biological control of *Fol2* by other fungi or by its lytic enzymes conveniently supported.

**3) *Exploitation of industrial residues. Lipases from Penicillium chrysogenum.*** Two lipases have been separated, characterized and one of them purified in industrial residues from the *Penicillin* manufacture.

dustriales de la fabricación de la Penicilina habiéndose purificado la mayoritaria.

En la actualidad se está realizando un *screening* de hongos productores de lipasa. Estas no se inducen, con el objeto de encontrar lipasas en cultivos autolizados con propiedades diferentes para posible uso industrial.

*At present a screening of fungi that produce lipase activity is carried out. The lipases excreted by the the fungi to the medium during the degradative process are not induced and can have different properties for industrial application.*

### Tesinas de Licenciatura / Master Thesis

- M.<sup>a</sup> Carmen Beltrá Lahoz. Estudio de lipasas en residuos industriales (*Penicillium chrysogenum*). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 1994. Directora: F. Reyes.

### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- CICYT, AGR91-0014-CO2-02 (1991-1994)
- CAM, CO-52/91 (1991-1994)
- DGICYT, PB 92-0001 (1992-1996)
- CICYT, BI094-140 (1994-1997)

### Publicaciones / Publications

- Nuero, O.M., Alfonso, C., Del Amo, F. and Reyes, F.: Study of  $\beta$ -1,3-glucanase activity during autolysis of *Aspergillus nidulans* by FPLC ion-exchange chromatography. *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 104-108, 1993.
- Vázquez, C., Reyes, F. and Martínez, M.J.: Comparative study of pectic activities from different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 210-213, 1993.
- Alfonso, C., Nuero, O.M., Santamaría, F. and Reyes, F.: Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr. Microbiol.* 29, --, 1994.
- Nuero, O.M., García-Lepe, R., Lahoz, M.C., Santamaría, F. and Reyes, F.: Detection of lipase activity on ultrathin-layer isoelectric focusing gels. *Anal. Biochem.* 222, 503-505, 1994.
- Rodríguez, J., Copa-Patiño, J.L., Reyes, F. and Pérez-Leblic, M.I.: A  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum* implicated in its cell-wall degradation. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 217-220, 1994.
- Santamaría, F., Nuero, O.M., Alfonso, C., Prieto, A., Leal, J.A. and Reyes, F.: Biochemical studies on the cell wall degradation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 by lytic enzymes from mucorales. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 152-155, 1994.

### Próximos Artículos / Forthcoming Articles

- Alfonso, C., Santamaría, F., Nuero, O.M., Prieto, A., Leal, J.A. and Reyes, F.: Biochemical studies on the cell wall degradation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 by its own lytic enzymes for its biocontrol. *Lett. Appl. Microbiol.* 20 (in press, 1995).
- Nuero, O.M.: 1995. Production of chitinase by *Fusarium* species. *Curr. Microbiol.* 30 (in press, 1995).

# Genética Bacteriana

## Bacterial Genetics

**RUBENS LÓPEZ GARCÍA**

Jefe de Grupo  
Group leader

**PEDRO A. GARCÍA GONZÁLEZ**

**ERNESTO GARCÍA LÓPEZ**

**JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ**

**CONCEPCIÓN RONDA LAÍN**

(Hasta IV-1993)

Investigadores

Senior Investigators

**FRANCISCO JAVIER MEDRANO**

**MARTÍN**

**ALEJANDRO VIÁN HERRERO**

Investigadores Contratados

Tenure-track Scientists

**ESTRELLA CORTÉS RUBIO**

B. Postdoctoral

Postdoctoral Fellow

**JORGE ALONSO PALACIOS**

**CARLOS ARRECUBIETA LARRAÑAGA**

**GERARDO J. GONZÁLEZ-SALAZAR PI**

(1993)

**ISABEL JADO GARCÍA (1993)**

**LAURA MARTÍN CARBAJO**

**ANA CARMEN MARTÍN RODRÍGUEZ**

**M.<sup>a</sup> AUXILIADORA PRIETO JIMÉNEZ**

**ANA ROA ARRANZ**

**A. ISABEL RODRÍGUEZ SÁNCHEZ**

**BEATO**

B. Predoctorales

Graduate Students

**ELOÍSA CANO CONGOSTO**

**MANUEL CARRASCO FERNÁNDEZ**

**FRANCISCA PILAR MORANTE**

**GONZÁLEZ**

Personal Técnico

Technical Staff

### 1) Estudios moleculares de genes de *Streptococcus pneumoniae* y sus bacteriófagos implicados en patogenicidad

Uno de los objetivos del presente proyecto es estudiar, a nivel molecular, algunos de los principales factores implicados en la virulencia de *Streptococcus pneumoniae*. Así, se investigarán los genes implicados en la síntesis, modificación y transporte del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* partiendo de la reciente clonación y secuenciación en nuestro laboratorio de un gen (*cap3A*) que codifica una deshidrogenasa implicada en tales procesos. Asimismo se estudiarán las bases moleculares de la sensibilidad/resistencia a la optoquina de gran importancia clínica y taxonómica. Por otra parte, se analizarán los genes implicados en la síntesis de la DNA girasa de neumococo como modelo para el desarrollo de nuevos antibióticos activos frente a este microorganismo. Por otra parte, dado que las enzimas líticas de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos proporcionan uno de los más claros ejemplos para demostrar la organización modular de las proteínas e ilustran sobre los mecanismos de evolución modular se analizará la influencia que ejercen los motivos repetidos que conforman el dominio C-terminal (ChBD) de las enzimas líticas de *S. pneumoniae* y de sus bacteriófagos en el reconocimiento de la pared celular de neumococo que contiene colina en sus ácidos teicoicos. El desarrollo de nuevos vectores de expresión de ChBD permitirá la preparación de nuevas proteínas de fusión entre el ChBD y proteínas de interés clínico e industrial. Las enzimas purificadas se estudiarán mediante técnicas tan-

### 1) Molecular studies of genes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages involved in pathogenesis

One of the aims of the present project is to study, at the molecular level, some of the most important virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. Thus, we shall investigate the genes involved in the synthesis, modification, and transport of the pneumococcal capsular polysaccharide taking into account our knowledge of one of those genes, namely *cap3A*, coding for a UDPG dehydrogenase recently cloned and sequenced in our lab. Moreover, the molecular basis of the optochin sensitivity/resistance, which possesses clinical as well as taxonomic relevance, will be also investigated. Furthermore, the characterization of the gene(s) responsible for the synthesis of DNA gyrase will help to develop new antibiotics active against *S. pneumoniae*. On the other hand, since the lytic enzymes of pneumococcus and its bacteriophages constitute a model system to study the mechanisms of modular evolution, we shall analyze the role that play the repeated motifs present on the C-terminal domain (ChBD) of the lytic enzymes of *S. pneumoniae* and its phages on the recognition of the choline residues present in the teichoic acids of the pneumococcal cell wall. We plan to develop new expression cloning vectors containing the ChBD to produce and purify proteins of clinical and industrial interest. The purified lytic enzymes will be studied using a variety of physicochemical as well as biochemical and genetic engineering techniques. In close relationship with the above subjects, we shall analyze several

to físicoquímicas como bioquímicas y de ingeniería genética. En esta línea de investigación se sitúa el análisis de varios genes de *Clostridium acetobutylicum* que codifican enzimas líticas y su estudio comparativo con cuatro isogenes que poseen dominios C-terminales, homólogos a los de neumococo. Finalmente, a partir de la secuenciación total del genoma de 19 kb del fago Cp-1 de neumococo, que contiene proteína terminal, se estudiará la organización génica de dicho fago analizándose la transcripción de su genoma. Se hará especial énfasis en el estudio funcional de los genes codificantes para la proteína terminal y la DNA polimerasa que intervienen en la peculiar replicación de estos genomas lineales.

**2) Eliminación biológica de contaminantes: Análisis y manipulación de rutas catabólicas bacterianas para la mineralización de compuestos aromáticos**

Grandes cantidades de compuestos orgánicos se vierten cada año a la biosfera de manera accidental o intencionada. Algunos de esos compuestos son tóxicos y relativamente resistentes a cualquier tipo de degradación, constituyendo una fuente importante de contaminación ambiental. La manipulación genética de rutas metabólicas de microorganismos es una de las aproximaciones experimentales más prometedoras para acelerar la evolución de esas rutas de degradación, y permitir el catabolismo de compuestos que contaminan el medio ambiente. El proyecto propone la caracterización bioquímica, genética y fisiológica de algunas rutas bacterianas de degradación de compuestos aromáticos. El proyecto persigue evaluar las capacidades degradativas de los microorganismos, mejorar éstas mediante ingeniería genética y explotarlas como vehículos de descontaminación ambiental.

*genes of Clostridium acetobutylicum encoding lytic genes and compare them with four isogenes that have C-terminal domains homologous to those of the pneumococcal lysins. Finally, taking as a starting point the determination of the complete nucleotide sequence of the 19-kb Cp-1 linear DNA, a pneumococcal bacteriophage containing terminal protein, we shall study the gene organization and the transcriptional map of its genome. An special interest will be focused on the functional analysis of the genes encoding the terminal protein and the DNA polymerase, two proteins directly implicated on the peculiar mechanism of replication of linear DNAs.*

**2) Bioremediation: Analysis and genetic manipulation of bacterial catabolic pathways for the mineralization of aromatics**

*Increasing quantities of man-made organic chemicals are released each year into the biosphere accidentally or deliberately. Some of these compounds are both toxic and recalcitrant, and constitute an important source of environmental pollution. Genetic manipulation of microbial catabolic pathways offers a powerful mean by which such compounds might be eliminated from the environment. This project proposes the biochemical, genetic and physiological characterization of bacterial pathways for mineralization of aromatic compounds. The project is addressed to the evaluation of the biodegradative properties of microbes, their genetic manipulation for improvement, and their exploitation as bioremediation vehicles.*

**Tesinas de Licenciatura y Tesis Doctorales / Master and Doctoral Theses**

- Gerardo José López-Salazar Pi. Estudios mediante ingeniería de proteínas de la autolisina LytA de *Streptococcus pneumoniae* e hiperexpresión de la proteína Ejl. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, 1993. T. de Licenciatura. Director: P. García González.
- Isabel Jado García. Caracterización y purificación de la 4-hidroxifenilacético hidroxilasa de *Escherichia coli* ATCC 11105. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, 1993. T. de Licenciatura. Directores: J.L. García López y M.<sup>a</sup> A. Prieto Jiménez.
- María Laura Martín Carbajo. Clonación, secuenciación y expresión del gen *pac* que codifica para la penicilina G acilasa de *Bacillus megaterium* ATCC14945. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 1994. T. de Licenciatura. Director: J.L. García López.
- Asunción Fenoll Comes. Estirpes atípicas de *Streptococcus pneumoniae*. Bases moleculares de la resistencia a optoquina. Universidad Complutense de Madrid, 1994. T. Doctoral. Directores: A.G. de la Campa y E. García López.

**Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Dr. Juan Morales Grillo. CIGB, La Habana, Cuba. (II a VI-1993 y III a VI-1994).
- Dr. Christian Croux INSA, Toulouse, Francia. (V-1994).

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- DGICYT, PB90-0069 (1991-1994)
- CICYT, SAL91-0898-C02-01 (1991-1994)
- DGICYT, PB93-0115-C02-01 (1994-1997)
- MEC, Programa de Cooperación con Iberoamérica (1993-1995)
- CSIC, Programa de Cooperación con CNRS (1992-1994)
- CICYT, AMB94-1030-CO2-02 (1994-1997)

**Artículos de Divulgación / Press Articles**

- R. López: Maclyn McCarty: un sabio olvidado. Cincuenta años del redescubrimiento del DNA. *Microbiología SEM* 10, 429-432, 1994.

**Publicaciones / Publications**

- Croux, C., Ronda, C., López, R. and García, J.L.: Interchange of functional domains switches enzyme specificity: Construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. *Mol. Microbiol.* 9, 1019-1025, 1993.
- Croux, C., Ronda, C., López, R. and García, J.L.: Role of the C-terminal domain of the lysozyme of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 in a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. *FEBS Lett.* 336, 111-114, 1993.
- García, E., García, P. and López, R.: Cloning and sequencing of a gene involved in the synthesis of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Mol. Gen. Genet.* 239, 188-195, 1993.
- 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: Metabolism and Structure of the Bacterial Sacculus*. (Eds.) M.A. de Pedro, W. Löffelhardt and J-V. Höltje. pp. 261-268. Plenum Press, 1993.
- González de la Peña, M.A., Villalba, M., García, J.L. and Rodríguez, R.: Cloning and expression of the major allergen from yellow mustard seeds, *Sin* a I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 648-653, 1993.

- Guisán, J.M., Álvaro, G., Fernández-Lafuente, R., Rosell, C.M., García, J.L. and Tagliatti, A.: Stabilization of an heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 455-464, 1993.
- 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: Metabolism and Structure of the Bacterial Sacculus*. (Eds.) M.A. de Pedro, J-V. Höltje and W. Löffelhardt. pp. 253-259. Plenum Press, 1993.
- Prieto, M.A., Pérez-Aranda, A. and García, J.L.: Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrate range. *J. Bacteriol.* 175, 2162-2167, 1993.
- Romero, A., López, R. and García, P.: Lytic action of cloned pneumococcal phage lysis genes in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 108, 87-92, 1993.
- Sanz, J.M., García, J.L., Laynez, J., Usobiaga, P. and Menéndez, M.: Thermal stability and cooperative domains of CPL1 lysozyme and its NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal modules. *J. Biol. Chem.* 268, 6125-6130, 1993.
- Arrecubieta, C., López, R. and García, E.: Molecular characterization of *cap3A* a gene from the operon required for the synthesis of the capsule of *Streptococcus pneumoniae* type 3: Sequencing of mutations responsible for the unencapsulated phenotype and localization of the capsular cluster on the pneumococcal chromosome. *J. Bacteriol.* 176, 6375-6383, 1994.
- Fenoll, A., Muñoz, R., García, E. and de la Campa, A.G.: Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: Characterization of the genes encoding the F<sub>0</sub> complex of the *S. pneumoniae* and *S. oralis* H<sup>+</sup> ATPases. *Mol. Microbiol.* 12, 587-598, 1994.
- García, E., García, P. and López, R.: Patogeneicidad y genes capsulares de neumococo. *Microbiología SEM* 10, 19-26, 1994.
- García, J.L., Díaz, E., Romero, A. and García, P.: Carboxy-terminal deletion analysis of the major pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* 176, 4066-4072, 1994.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Barbero, J.L., Mancheño, J.M., Gasset, M., Oñaderra, M., López-Otín, C., Ortega, S., García, J.L. and Gavilanes, J.G.: Overproduction and purification of biologically active native-sarcin in *Escherichia coli*. *Gene* 142, 147-151, 1994.
- López, R., García, J.L., Ronda, C., García, E. and García, P.: Enzimas líticas del sistema de neumococo. *Microbiología SEM* 10, 13-18, 1994.
- Prieto, M.A. and García, J.L.: Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269, 22823-22829, 1994.
- Roa, A., García, J.L., Salto, F. and Cortés, E.: Changing the substrate specificity of penicillin acylases from *Kluyvera citrophila* through selective pressure. *Biochem. J.* 303, 869-876, 1994.

**Próximos artículos / Forthcoming Papers**

- Fenoll, A., Muñoz, R., García, E. and de la Campa, A.G.: Optochin sensitivity is encoded by the *atpC* gene of the *S. pneumoniae atp* ( $F_0F_1$  H<sup>+</sup>ATPase) operon. In: *Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci*. (Ed.) J.J. Ferreti, (in press, 1995).
- López, R., García, E., García, P. and García, J.L.: Architecture and domain interchange of the pneumococcal cell wall lytic enzymes. In: *Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci*. (Ed.) J.J. Ferreti, (in press, 1995).
- Martín, B., García, P., Castanié, M.-P. and Claverys, J.-P.: The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* 15 (in press, 1995).
- Martín, L., Prieto, M.A., Cortés, E. and García, J.L.: Cloning and sequencing of the *pac* gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *FEMS Microbiol. Lett.* (in press, 1995).
- Roa, A., Castellón, M.P., Goble, M.L., Virden, R. and García, J.L.: New insights on the specificity of penicillin acylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press, 1995).
- Sánchez-Beato, A.R., Ronda, C. and García, J.L.: Tracking the evolution of bacterial choline-binding domain: molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* gene. *J. Bacteriol.* (in press, 1995).
- Calero, M., Méndez, E. and García, E.: Expression of the human complex-forming glycoprotein HC ( $\alpha_1$ -microglobulin) in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* (in press, 1995).

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

---

**MIGUEL ANGEL PEÑALVA SOTO**  
Jefe de Grupo - Investigador  
*Group leader - Senior Investigator*

**JOSÉ M. FERNÁNDEZ-CAÑÓN**  
**MARGARITA OREJAS SUÁREZ**  
**M.<sup>a</sup> TERESA SUÁREZ GONZÁLEZ**  
Investigadores Contratados  
*Tenure-track Scientists*

**EDUARDO ESPESO FERNÁNDEZ**  
(Dr. desde VI/1994)  
**BEATRIZ PÉREZ ESTEBAN**  
**ALEJANDRO VIAN HERRERO**  
(Hasta VI/1993)  
B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**ELENA REYOY FERNÁNDEZ**  
Personal Técnico  
*Technical Staff*

---

Estamos usando la ruta biosintética de penicilina en el hongo ascomiceto *Aspergillus nidulans* como modelo para investigar la regulación de la expresión génica en el metabolismo secundario. Dicho organismo es susceptible de manipulación por ingeniería genética y permite realizar análisis genético formal.

La biosíntesis de penicilina está regulada a nivel transcripcional por el pH ambiental. Este modo de regulación está mediado por PacC, un factor transcripcional cuyo dominio de unión a DNA contiene tres dedos de zinc. PacC activa la transcripción de los genes «alcalinos» (como *ipnA*, un gen estructural de la ruta de penicilinas) en respuesta a un pH extracelular alcalino. Arst *et al.* han usado el análisis genético formal para identificar seis genes *pal*, cuyos productos median la transducción de la señal, transmitiendo los cambios en el pH ambiental al activador transcripcional.

Estamos usando técnicas de footprinting *in vitro* y de genética en reverso para estudiar el detalle de la unión de PacC a sus secuencias diana en el promotor de *ipnA*, así como la función *in vivo* de dichas secuencias. Así mismo, estudiamos las modificaciones postranscripcionales en PacC, mediadas por los productos de los genes *pal*, que causan su activación en respuesta a un pH extracelular alcalino. Para ello, usamos un ensayo *in vitro* con extractos proteicos de *Aspergillus* correspondientes a distintas condiciones mutantes en el circuito regulador por pH ambiental. Finalmente, usando un abordaje bioquímico y el sistema del doble híbrido en levadura, buscamos

*We are using the penicillin pathway of Aspergillus nidulans, a filamentous ascomycete amenable to sophisticated formal and molecular genetic analysis, as a model to investigate the regulation of gene expression in fungal secondary metabolism. Penicillin biosynthesis is regulated at the transcriptional level by ambient pH. This mode of regulation is mediated by the zinc finger transcription factor PacC, which activates alkaline expressed genes, such as ipnA (a penicillin structural gene) in response to external alkaline pH. Formal genetic analysis by Arst and colleagues has identified (six) pal genes which encode products involved in signal transduction, transmitting changes in ambient pH to the transcriptional factor. In vitro footprinting and reverse genetics techniques are being used to study the details of PacC binding to its cognate targets at the ipnA promoter and to establish the in vivo function of these sites. We are also studying the pal genes-dependant postranslational modifications which result in PacC activation in response to ambient alkaline pH, using an in vitro assay with Aspergillus protein extracts corresponding to different mutant conditions in the pH regulatory system. Finally, we are searching for proteins downstream PacC which could mediate its dual function (PacC is both an activator and a repressor of transcription) by using a biochemical approach as well as the yeast two hybrid system. Results of potential interest for industrial penicillin production are being currently extrapolated to the closely related industrial organism Penicillium chrysogenum, in which tailored regulatory mutations are being introduced by transformation.*



proteínas que actúen corriente abajo de PacC, a través de las cuales dicho factor pudiera ejercer su función dual (puesto que es simultáneamente un activador y un represor de la transcripción). Los resultados obtenidos con *Aspergillus* que pudieran tener relevancia industrial se extrapolan mediante la introducción por ingeniería genética de mutaciones reguladoras «de diseño» en el organismo industrial *Penicillium chrysogenum*, estrechamente emparentado con *Aspergillus*.

### Tesis Doctorales / Doctoral Theses

- Alejandro Vian Herrero. Clonación del gen *pyr-1* de *Cephalosporium acremonium* y su uso en un vector de transformación. Universidad Complutense de Madrid, 1993. Director: M.A. Peñalva.
- Eduardo A. Espeso Fernández. Control por genes reguladores de amplio dominio de la biosíntesis de penicilina en *Aspergillus nidulans*. Universidad Complutense de Madrid, 1994. Director: M.A. Peñalva.

### Científicos Invitados / Visiting Scientists

- Dr. José Manuel Matés Sánchez, Department of Infectious Diseases and Bacteriology, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London, U.K. (I y II/1993).
- Dr. Leo de Graaff, Department of Genetics, Universidad de Wageningen, The Netherlands. EMBO short-term fellowship. (IX a XI/1994).

### Organismos Financiadores / Funding Agencies

- CICYT, BIO91-671 (1991-1994)
- CICYT, BIO94-0932 (1994-1997)
- D.G. XII de la Comisión Europea: Bridge BIO-CT90-0169 (1990-1993)
- D.G. XII de la Comisión Europea: Biotech BIO2-CT93-0174 (1993-1996)

### Publicaciones / Publications

- Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr. and Peñalva, M.A.: pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* 12, 3947-3956, 1993.
- Martínez-Blanco, H., Orejas, M., Reglero, A., Luengo, J.M. and Peñalva, M.A.: Characterisation of the gene encoding acetyl-CoA synthetase in *Penicillium chrysogenum*: conservation of intron position in plectomycetes. *Gene* 130, 265-270, 1993.
- Peñalva, M.A., Espeso, E., Pérez-Esteban, B., Orejas, M., Fernández-Cañón, J.M. and Martínez-Blanco, H.: Expression of fungal genes involved in penicillin biosynthesis. *World J. Biotechnol* 9, 461-467, 1993.
- Pérez-Esteban, B., Orejas, M., Gómez-Pardo, E. and Peñalva, M.A.: Molecular characterisation of a fungal secondary metabolism promoter: transcription of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthetase gene is modulated by upstream negative elements. *Mol. Microbiol.* 9, 881-895, 1993.

- Espeso, E.A. and Peñalva, M.A.: *In vitro* binding of the two finger repressor CreA to several consensus and non-consensus sites at the *ipnA* upstream region is context dependent. *FEBS Letters* 342, 43-48, 1994.
- Luengo, J.M. and Peñalva, M. A.: Penicillin biosynthesis. En: *Aspergillus: 50 years on.* (Eds.) S. D. Martinelli and J. R. Kinghorn . Elsevier, Amsterdam, London, pp. 603-638, 1994 .

#### Próximos Artículos / Forthcoming Articles

- Fernández-Cañón, J.M. and Peñalva, M.A.: Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 246, 110-118, 1995.
- Espeso, E.A., Fernández-Cañón, J.M. and Peñalva, M.A.: Carbon regulation of penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*: a minor effect of mutations in *creB* and *creC*. *FEMS Microbiol. Letters* 126, 63-68, 1995.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A. and Arst, H.N., Jr.: The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14, 779-790, 1995.



Fotografía: Racimo de esporas asexuales del *Aspergillus Nidulans*.

Photograph: Asexual reproductive spores of *Aspergillus Nidulans*.

# Genética Molecular de *Pseudomonas* Molecular Genetics of *Pseudomonas*

---

**VÍCTOR DE LORENZO PRIETO**

Jefe de Grupo - Investigador

*Group leader - Senior Investigator*

**GIOVANNI BERTONI**

**ÁNGEL CEBOLLA RAMÍREZ**

**JOSÉ PÉREZ MARTÍN**

**CAROLINA SOUSA MARTÍN**

B. Postdoctorales

*Postdoctoral Fellows*

**ILDEFONSO CASES DÍAZ**

**LUCÍA ESCOLAR BLASCO**

**SILVIA FERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**AMPARO HARO CASTUERA**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

---

## **1. Monitorización ambiental de contaminantes químicos con biosensores basados en promotores bacterianos.**

La actividad industrial del último siglo ha liberado al medio ambiente grandes cantidades de compuestos químicos totalmente ajenos a la biosfera (compuestos xenobióticos), en particular compuestos alquil- y halo-aromáticos. Aún así, una variedad de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, han desarrollado la capacidad de utilizar algunos estas moléculas como fuente de carbono. El fenómeno que intentamos explotar es que la transcripción de los operones catabólicos para la biodegradación de especies xenobióticas se da, en general, sólo cuando las células se exponen a los sustratos correspondientes o análogos estructurales y por tanto, es una indicación de la presencia y biodisponibilidad de contaminantes ambientales específicos. Esta línea de trabajo intenta una combinación de promotores bacterianos con sistemas informadores (*reporters*) acoplables a una detección analítica para el desarrollo de esquemas de bio-monitorización de contaminantes aromáticos y de metales pesados. Para ello, estamos estudiando las bases moleculares del reconocimiento de compuestos aromáticos prototípicos por proteínas reguladoras como XylR y XylS (de la ruta TOL de degradación de tolueno) o NahR (de la ruta NAH de degradación de naftaleno), capaces de interactuar con ellos. Estos estudios sentarán las bases para el diseño dirigido de nuevos reguladores transcripcionales que respondan a especies químicas predeterminadas y su acoplamiento a sistemas de detección óptométricos e inmunológicos.

**1. Environmental monitoring of chemical pollutants with biosensors based on bacterial promoters.** Industrial activities during this century have released into the environment considerable amounts of novel chemicals somewhat alien to the biosphere (xenobiotic compounds), in particular alkyl- and halo-aromatic compounds. A variety of bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* have evolved the capacity to utilize these molecules as a carbon source. The phenomenon at the basis of this project is that transcription of the catabolic operons for biodegradation of xenobiotic chemical species appears, in general, only when cells encounter the corresponding substrates or structural analogs and, therefore, it is an indication of the presence an bioavailability of specific environmental pollutants. This project is aimed to the combination of bacterial promoters with specific-purpose reporter systems eligible for analytical detection for development of novel schemes of bio-monitoring aromatic pollutants. For this, we exploit the molecular bases of the recognition of archetypical chloro-aromatic compounds by regulatory proteins such as XylR, XylS (of the toluene degradation pathway TOL) and NahR (of the naphthalene degradation pathway NAH), which are able to interact with them. These studies lay the bases for the directed design of novel transcriptional regulators responsive to predetermined chemical species and their coupling to optical and immunological detection systems.

**2. Ingeniería metabólica de rutas degradativas para compuestos cloroaromáticos.** Los bifenilos policlorados (PCBs) y los cloro-toluenos son compuestos de síntesis que se han utilizado masivamente durante este siglo en multitud procesos como componentes dieléctricos o formando parte de disolventes de uso industrial. Estas especies químicas son particularmente tóxicas y recalcitrantes y por tanto su acumulación constituye un serio problema medioambiental. Una variedad de bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de convertir los congéneres de PCBs menos clorados, hasta clorobenzoatos, deteniéndose en ese punto el proceso biodegradativo. En otros casos, algunos enzimas de rutas catabólicas heterólogas son capaces de mono- o dioxigenar el anillo aromático de los cloro-toluenos. Esta línea de trabajo se centra en la identificación de los cuello de botella, tanto reguladores como enzimáticos, que previenen el catabolismo completo de los PCBs y los cloro-toluenos hasta intermediarios del ciclo de Krebs. Para ello, reclutamos segmentos catabólicos (segmentos de DNA que determinan enzimas de rutas de biodegradación) de cepas diferentes y las combinamos para aumentar el fenotipo degradativo. El resultado es la generación de estirpes con capacidades metabólicas aumentadas para degradar o co-oxidar estos compuestos.

**2. Metabolic engineering of catabolic pathways for chloro-aromatic compounds.** Polychloro biphenyls (PCBs) and chloro-toluenes are synthetic compounds that have been extensively used during this century in many processes as dielectric components or in formulations of solvents for industrial use. These chemical species are particularly toxic and recalcitrant and, therefore, their accumulation becomes a serious environmental problem. Some strains of the genus *Pseudomonas* are able to convert lightly-chlorinated PCB congeners down to chloro-benzoates, at which point, the biodegradative process uses to stop. In other cases, some enzymes of heterologous catabolic pathways are able to mono- or dioxygenate the aromatic ring of chloro-toluenes. This project is focused on the identification of regulatory and enzymatic bottlenecks which prevent full catabolism of PCBs and chloro-toluenes down to Krebs's cycle intermediates. For this, we recruit catabolic segments (i.e., DNA segments encoding enzymes of biodegradation pathways) from different strains and these are rationally combined to enhance a certain degradative phenotype. The result is the generation of novel strains with increased metabolic abilities for degradation or co-oxidation of these compounds.

#### **Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Barbara Tzschaschel, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) Braunschweig, RFA.
- Sven Panke, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) Braunschweig, RFA.

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CE, BRIDGE BIOT-CT91-0293 (1991-1993)
- CAM, C260/91 (1991-1994)
- CICYT, BIO92-1018-CO2-1 (1993-1995)
- CE, BIOTECH BIO2-CT92-0084 (1992-1995)
- REPSOL/Instituto Nacional de Hidrocarburos

**Publicaciones / Publications**

- De Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. and Timmis, K.: Analysis of gene products of *Pseudomonas* with lacIq/Ptrp-lac plasmids and transposons conferring conditional phenotypes. *Gene* 123, 17-24, 1993.
- De Lorenzo, V., Cases, I., Herrero, M. and Timmis, K.N.: Early and late responses of TOL promoters to pathway inducers: Identification of Growth-phase dependent promoters in *Pseudomonas putida* with lacZ-tet bicistronic reporters. *J. Bacteriol.* 175, 6902-6907, 1993.
- De Lorenzo, V., Fernández, S., Herrero, M. and Timmis, K.: Engineering of alkyl- and haloaromatic-responsive gene expression with mini-transposons containing regulated promoters of biodegradative pathways of *Pseudomonas*. *Gene* 130, 41-46, 1993
- Herrero, M., de Lorenzo, V., Ensley, B. and Timmis, K.N.: A T7 RNA polymerase-based system for the construction of *Pseudomonas* strains with phenotypes dependent on TOL-meta pathway effectors. *Gene* 134, 103-106, 1993.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., Timmis, K.: Identification of a cis-acting sequence within the Pm promoter of the TOL plasmid which confers XylS-mediated responsiveness to substituted benzoates. *J. Mol. Biol.* 230, 699-703, 1993.
- De Lorenzo, V. and Rojo F.: Ingeniería genética de bacterias para aplicaciones medioambientales. In: *Avances en Ingeniería Genética*. (Ed.) M. Vicente. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1994.
- De Lorenzo, V. and Timmis, K.: Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived mini-transposons. *Meth. Enzymol.* 235, 386-405, 1994.
- De Lorenzo, V.: Designing microbial systems for gene expression in the field. *Trends Biotech.* 12, 365-371, 1994.
- De Lorenzo, V.: Genetic strategies to engineer expression systems responsive to relevant environmental signals (Eds.) F. O'Gara, D. Dowling, B. Boesten. pp. 91-101. *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*. VCH, Weinheim, 1994.
- De Lorenzo, V.: «Touching an elephant in the darkness» or How to get the whole picture of Biotechnology. *Trends Biotech.* 12, 2-5, 1994.
- Díaz, E., Munthali, M., de Lorenzo, V. and Timmis, K. N.: Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. *Mol. Microbiol.* 13, 855-861, 1994.
- Fernández, S., Shingler, V. and de Lorenzo, V.: Cross-regulation by XylR and DmpR activators of *Pseudomonas putida* suggests that transcriptional control of biodegradative operons evolves independently of catabolic genes. *J. Bacteriol.* 176, 5052-5058, 1994.
- Kessler B., Timmis, K.N. and de Lorenzo, V.: The organization of the Pm promoter of the TOL plasmid reflects the structure of its cognate activator protein XylS. *Mol. Gen. Genet.* 244, 596-605, 1994.
- Kessler, B., Herrero, M., Timmis K. N. and de Lorenzo, V.: Genetic evidence that the XylS regulator of the TOL meta-operon of *Pseudomonas* controls Pm promoter through weak DNA-protein interactions. *J. Bacteriol.* 176, 3171-3176, 1994.
- Kessler, B., Marqués, S., Köhler, T., Ramos, J.L., Timmis, K.N. and de Lorenzo, V.: Cross-talk between catabolic pathways in *Pseudomonas*: XylS-dependent and independent activation of the TOL meta-operon require the same cis-acting sequences within the Pm promoter. *J. Bacteriol.* 176, 5578-5582, 1994.

- Martínez, J.L., Herrero, M. and de Lorenzo, V.: The organization of intercistronic regions of the aerobactin operon of pColV-K30 may account for the differential expression of the iucABCD iutA genes. *J. Mol. Biol.* 238, 288-293, 1994.
- O'Sullivan, D.J., Dowling, D.N., de Lorenzo, V. and O'Gara, F.: Escherichia coli ferric uptake regulator (Fur) can mediate regulation of a pseudomonad iron-regulated promoter. *FEMS Microbiol. Lett.* 117, 327-332, 1994.
- Pérez-Martín, J., Rojo F. and de Lorenzo, V.: Promoters responsive to DNA bending : A common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev.* 58, 268-290, 1994.
- Pérez-Martín, J., Timmis, K.N. and de Lorenzo, V.: Co-regulation by bent DNA: Functional substitutions of the IHF site at the s54-dependent promoter Pu of the upper-TOL operon by intrinsically curved sequences. *J. Biol. Chem.* 269, 22657-22662, 1994.
- Ramos, J.L., Díaz, E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O'Gara, F., Ramos, C. and Timmis, K.: Behavior of bacteria designed for biodegradation. *Bio/Technology* 12, 1349-1356, 1994.

#### **Próximos Artículos / Forthcoming Articles**

- Martínez, J.L. and de Lorenzo, V. : *Molecular strategies of iron acquisition by bacteria : The Fur protein and the aerobactin case history* (Ed) J. Abadía, Developments in plant and Soil Sciences : Iron in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands 335-341, 1995.
- Fernández, S., de Lorenzo, V. and Pérez-Martín, J.: Activation of the transcriptional regulator XylR of Pseudomonas putida by release of repression between functional domains. *Mol. Microbiol.* (in press, 1995).
- Kristensen, C., Eberl, L., Sánchez-Romero, J.M., Giskov, M., Molin, S. and de Lorenzo, V.: Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J. Bacteriol.* 177, 52-58, 1995.

# Replicación y Mantenimiento de Plásmidos Bacterianos

## *Replication and Maintenance of Bacterial Plasmids*

**RAMÓN DÍAZ OREJAS**

**M.ª ELENA FERNÁNDEZ  
TRESGUERRES**

**GERTRUDIS DE TORRÓNTEGUI**

Jefes de Grupo - Investigadores

*Group leaders - Senior Investigators*

**RAFAEL GIRALDO SUÁREZ**

(Desde XI-1994)

**MARÍA ANGELES DE LA TORRE (1993)**

B. Postdoctorales

*Postdoctoral Fellows*

**GUILLERMO DE LA CUEVA MÉNDEZ**

**DARÍO GARCÍA DE VIEDMA**

(Dr. desde XII-1994)

**BEATRIZ MAESTRO (Desde I-1994)**

**ROSARIO SABARIEGOS JAREÑO**

(Desde IX-1993)

**JUÁN MANUEL SÁNCHEZ ROMERO**

B. Predoctorales

*Graduate Students*

**CONSUELO PARDO ABARRIO**

**ANA M.ª SERRANO LÓPEZ**

Personal Técnico

*Technical staff*

### Replicación y estabilidad de plásmidos de bacterias Gram-negativas

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 plásmido pPS10 de *Pseudomonas* y en el factor R1 de resistencia a antibióticos de enterobacterias. También se trabaja en el desarrollo de vectores para la utilización medioambiental de *Pseudomonas*.

Los estudios con el plásmido pPS10 (Fig. 1) se han centrado en el análisis de la expresión, función y motivos estructurales de la proteína RepA, que es el iniciador de replicación del plásmido y un regulador transcripcional de su propia síntesis. Estos estudios han permitido i) caracterizar las señales y productos de transcripción del gen *repA*, ii) establecer las interacciones de la proteína RepA con el origen de replicación y con el promotor del gen *repA*, iii) establecer la participación de monómeros de RepA en la interacción con el origen de replicación y de dímeros de la misma en la interacción con el promotor *repA*, iv) identificar los motivos LZ y HTH de RepA como motivos de interacción específica proteína-proteína y proteína-DNA respectivamente, v) verificar el papel esencial de estos dos motivos tanto en replicación como en regulación vi) discriminar dentro del motivo LZ residuos importantes en regulación o en replicación y vii) evaluar el papel importante de interacción

### *Replication and stability of plasmids from Gram-negative bacteria*

*Our group is involved in the analysis of the replication and stability systems of plasmids from Gram-negative bacteria focussing in the plasmid pPS10 isolated from Pseudomonas, and in the antibiotic resistance factor R1 of enterobacteria. We are also involved in the development of cloning vectors suitable to construct strains for environmental purposes.*

*The studies on plasmid pPS10 have been centered in the analysis of the expression, function and structural motifs of RepA, the protein that initiates plasmid replication and that is a transcriptional regulator of its own synthesis. These studies have led to i) the identification of the repA promoter and its transcriptional products, ii) the establishment of the interactions of the RepA protein with the origin of replication and with the promoter of the repA gene, iii) the identification of monomers and dimers of RepA as the forms active in binding to the origin of replication and the promoter-operator region respectively, iv) the identification of the LZ and HTH motifs of RepA as involved in RepA-RepA interactions and RepA-DNA interactions respectively, v) the evaluation of the essential roles of these motifs in replication and regulation, vi) the discrimination within the LZ motif of residues that play differential roles in replication and regulation and vii) the evaluation of the important role played*

nes mediadas por el motivo LZ en el control de replicación y rango de huésped del plásmido.

Los estudios de replicación con el plásmido R1 han permitido determinar el requerimiento de la proteína DnaK inducida por choque térmico y han identificado al componente letal del sistema de estabilidad *parD* de este plásmido como un inhibidor de replicación dependiente de DnaB. Esta identificación ha sido facilitada por el desarrollo y caracterización de un nuevo sistema de replicación *in vitro* para el DNA del fago P4. La replicación *in vitro* del DNA de P4 se inicia en un origen único o muy preferente, ocurre a través de intermedios, es bidireccional, y está catalizada por DNA polimerasa III además requiere las proteínas DnaK y DnaJ, que son inducibles por choque térmico, así como la proteína de unión a DNA de cadena sencilla SSB y la actividad de la DNA girasa. En cambio, la replicación es independiente de las proteínas del huésped DnaA, DnaB, DnaC y DnaG, debido a la contribución de las actividades helicasa y primasa del iniciador específico, proteína  $G_p\alpha$ .

Los estudios con el sistema de estabilidad *parD* (Fig. 2) han permitido desarrollar ensayos bioquímicos para las dos proteínas del sistema, el componente letal Kid y el antagonista Kis. Como resultado de estos estudios se sabe i) que las proteínas Kis y Kid interactúan y forman un complejo muy estable, ii) que un complejo de estas proteínas interactúa con secuencias específicas del promotor del sistema, iii) que la proteína Kid es un inhibidor de inicio de replicación que actúa sobre la helicasa del sistema, proteína DnaB, y iv) que el antagonista Kis neutraliza la inhibición de

by the LZ motif in control of plasmid replication and plasmid host-range.

*Studies on plasmid R1 replication showed the requirement of the heat shock protein DnaK for plasmid replication and have identified the killer component of the plasmid stability system parD as a specific inhibitor of DnaB-dependent replication. This identification has been facilitated by a new in vitro replication system for the DNA of phage P4 that we have developed. Replication of the DNA of phage P4 initiates in a unique origin of replication, is bidirectional, occurs by a type mechanism, and requires DNA pol III, the DnaK and DnaJ heat shock proteins, SSB protein and DNA gyrase. However, this replication is independent on the DnaA, DnaB, DnaC and DnaG proteins of the host due to the helicase and primase activities of the specific initiator, the  $G_p\alpha$  protein*

*Studies on the parD stability system of plasmid R1 have established biochemical assays for the two proteins of the system, the killer protein Kid and the antagonist Kis. As the result of these studies it is now known that i) the Kis and Kid proteins interact to form a very stable complex, ii) a complex of Kis and Kid interact with specific sequences of the parD promoter, iii) the Kid protein is an inhibitor of replication acting most probably on the DnaB helicase and iv) the antagonist, protein Kis, neutralizes the inhibition of replication mediated by Kid and in combination with this protein can increase the efficiency of replication. It is also known that the target of the Kid protein is conserved in Pseudomonas aeruginosa.*

*We have developed vectors for environmental purposes in collaboration with*



replicación mediada por el componente letal *Kid* y en combinación con esta proteína puede aumentar la eficacia del proceso replicativo. La diana del componente letal está conservada en *Pseudomonas aeruginosa*.

El desarrollo de vectores para usos medioambientales se está realizando en colaboración con el Dr. de Lorenzo. Fruto de esta colaboración ha sido el desarrollo de un sistema que permite la excisión selectiva de secuencias no deseadas introducidas en el cromosoma de *Pseudomonas* durante la integración en el mismo de secuencias de interés. También se han desarrollado nuevos vectores derivados de pPS10 que incorporan dianas de corte poco frecuente, marcadores para uso medioambiental, un sistema que permite su movilización desde *E. coli* a distintos huéspedes y mutaciones que permiten ampliar o atenuar la replicación de los vectores.

*Dr. de Lorenzo Laboratory. As a result of this collaboration a system for the selective excision of specific sequences used transiently during the integration of particular genes in the chromosome, has been developed. New vectors, based in the pPS10 replicon, that contain restriction sites of interest, mobilization sequences and mutations in the plasmid that increase the host range or decrease the efficiency of pPS10 replication have been also developed.*

#### **Tesis Doctorales / Doctoral Thesis**

- Darío García de Viedma del Álamo. Análisis de la proteína RepA del plásmido pPS10: interacciones y motivos implicados en autorregulación e inicio de replicación. Universidad de Alcalá de Henares, 1994. Director: R. Díaz Orejas.

#### **Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Guadalupe Grandoso Maraña. Departamento de Genética Molecular. Universidad de Cantabria. Santander. (III-1994).

#### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

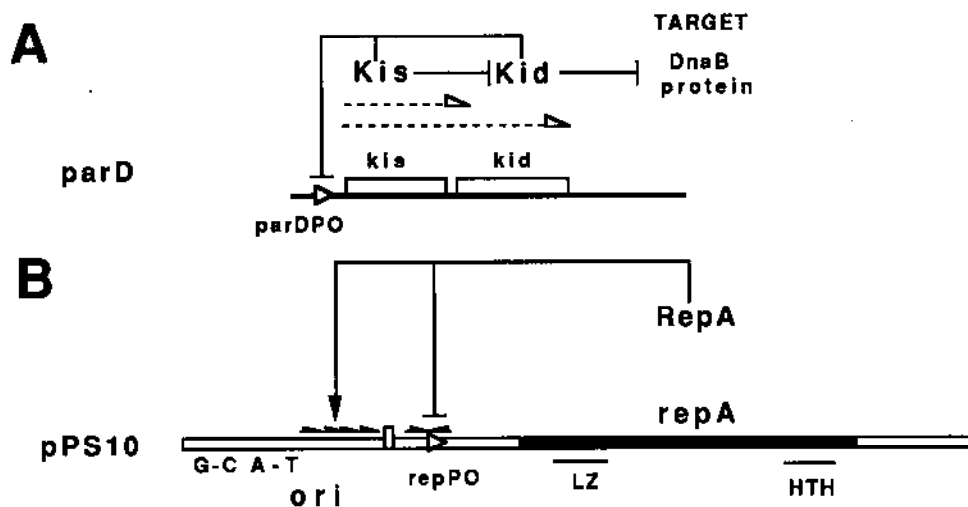
- CICYT, BIO91-1055 (1992-1994)
- CICYT, BIO92-1018-C02-02 (1992-1995)
- CICYT, BIO94-0707 (1994-1996)

**Publicaciones / Publications**

- Giraldo-Suárez, R., Fernández-Tresguerres, E., Díaz-Orejas, R., Malki, A. and Kohiyama, M.: The heat shock DnaK protein is required for plasmid R1 replication and it is dispensable for plasmid ColE1 replication. *Nucl. Acids Res.* 21, 5495-5499, 1993.
- Díaz Orejas, R., Ziegelin, G., Lurz, R. and Lanka, E.: Phage P4 DNA replication *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* 22, 2065-2070, 1994.
- Thomas C.M., Wellington, M.H., Díaz-Orejas, R. and Espinosa, M.: Molecular biology and ecology of gene transfer and propagation promoted by plasmids. *Microbiology* 140, 1799-1801, 1994.

**Próximos Artículos / Forthcoming Papers**

- García de Viedma, D., Giraldo-Suárez, R., Ruíz-Echevarría, M.J., Lurz, R. and Díaz-Orejas, R.: Transcription of *repA*, the gene of the initiation protein of the *Pseudomonas* plasmid pPS10, is autoregulated by sequential interactions of the RepA protein at a symmetrical operator. *J. Mol. Biol.* (in press, 1995).
- Kristensen, C., Eberl, L., Sánchez-Romero, J.M., Givskov, M., Molins, S. and de Lorenzo, V.: Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J. Bacteriol.* (in press, 1995).
- Ruiz-Echevarría, M.J., Giménez-Gallego, G., Sabariego-Jareño, R. and Díaz-Orejas, R.: A small protein of the *parD* stability system of plasmid R1 is an inhibitor of DNA replication acting at the initiation of DNA synthesis. *J. Mol. Biol.* (in press, 1995).



**A:** Sistema de estabilidad *parD* del plásmido R1.  $\square$  mRNA.  $\triangleright$  promotor-operador.  $\perp$  interacciones inhibitorias. **B:** replicón básico del plásmido pPS10 de *Pseudomonas*. ori: origen de replicación. *repA*: gen de la proteína iniciadora.  $\triangleright$  promotor-operador de *repA*.  $\square$  secuencias repetidas.  $\blacktriangledown$  activación.  $\perp$  inhibición. LZ y HTH: motivos de dimerización y unión a DNA de la proteína RepA.

**A:** *parD* stability system of plasmid R1.  $\square$  *parD* mRNAs.  $\triangleright$  *parD* promoter-operator.  $\perp$  inhibitory interactions. **B:** basic replicon of the *Pseudomonas* plasmid pPS10. ori: origin of replication. *RepA*: initiation protein.  $\triangleright$  *repA* promoter-operator.  $\square$  repeats.  $\blacktriangledown$  activation.  $\perp$  inhibition. LZ and HTH: dimerization and DNA binding motifs found in *RepA*.

# Transformación de la Lignocelulosa por Microorganismos y sus Implicaciones Biotecnológicas

## *Transformation of Lignocellulose by Microorganisms and its Biotechnological Implications*

---

**ALDO E. GONZÁLEZ B.**

Jefe de Grupo - Personal Científico  
*Group Leader - Senior Investigator*

**MARÍA DE LA LUZ FIDALGO**

**JUAN B. FERNÁNDEZ LARREA**

B. Postdoctorales  
*Postdoctoral Fellows*

**ANA M.ª CALVO**

**ANA I. LÓPEZ-ARCHILLA**

**MARIANA MANSUR**

**M.ª DEL CARMEN TERRÓN**

B. Predoctorales  
*Graduate Students*

**PETER KNOBLICH**

**MOU PAL**

Pregraduados  
*Undergraduate Students*

---

### **Transformación de la lignocelulosa por microorganismos y sus implicaciones biotecnológicas**

Los estudios de biodecoloración de los efluentes de la industria de pulpa de papel, constituidos fundamentalmente por alcalilignina, se orientaron a la optimización de este proceso en condiciones controladas del laboratorio. Se utilizó un biorreactor de diseño original con vista a estudiar las enzimas responsables de la decoloración con la cepas seleccionadas. De forma paralela se realizó la monitorización de los cambios químicos producidos por los hongos en la alcalilignina tratada, mediante técnicas analíticas.

Se llevaron a cabo estudios comparativos de las diferentes fracciones de la lignocelulosa de la paja de trigo obtenidas en condiciones controladas de laboratorio, lo que permitió conocer las interrelaciones que se establecen entre ellas. Posteriormente se procedió a la caracterización química de su lignina mediante técnicas analíticas destructivas y no destructivas, lo que proporcionó información adicional sobre su naturaleza química. Este conjunto de objetivos y tareas se enmarca en los proyectos del Programa ECLAIR de la CE que están enfocados a la biodesignificación como una alternativa viable a los tratamientos químicos actualmente en uso.

A partir de 1994 se dio comienzo a los primeros estudios enzimáticos con vista a esclarecer los mecanismos de la biodegradación de la lignina, así como al estudio de los genes implicados en este proceso. Se planificaron tres objetivos: i)

*The studies of biodecolorization of the effluents from paper pulp industry, made up principally of alkalilignin, were oriented towards the optimization of this process under controlled laboratory conditions. An especially designed bioreactor was used to study the enzymes responsible for decolorization with the selected fungal strains. Parallely, monitorization of the chemical changes brought about by the selected fungi in the alkalilignin, were carried out by means of analytical techniques.*

*Comparative studies were done on the different wheat straw lignocellulosic fractions obtained in controlled laboratory conditions to determine the interrelationship established between them. Later, chemical characterization of the wheat straw lignin was carried out through both destructive and non-destructive analytical techniques, which provided additional information on its chemical nature. This group of goals and tasks are part of framework of the ECLAIR Program of the CE, which focuses on bio-delignification as a viable alternative to the chemical treatments currently in use.*

*In 1994 the first enzymatic studies were initiated with the objective of gaining further understanding of the mechanisms of lignin biodegradation along with the study of the genes involved in this process. Three principal objectives were established: i) Optimization of cultures and microbial physiology. The selected fungi of the genera Ganoderma, Phanerochaete, Peniophora, Stropharia and others have been studied in defined media (which include lignin-related synthetic*

Optimización de los cultivos y fisiología microbiana. Los hongos seleccionados de los géneros *Ganoderma*, *Phanerochaete*, *Peniophora*, *Stropharia* y otros, han sido estudiados en medios definidos (que incluyen compuestos sintéticos similares a la lignina) e indefinidos (que contienen diferentes tipos de ligninas obtenidas mediante métodos físicos y químicos) para estimar la capacidad de los hongos de utilizar estos compuestos, sintéticos y/o las ligninas con diferentes grados de alteración, como fuente de carbono. El seguimiento de la degradación de sustratos sólidos (paja, bagazo o madera) se realizó mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión. ii) Enzimología. En los líquidos de cultivo se han ensayado actividades enzimáticas de, lignina peroxidasa, peroxidasa dependiente de manganeso, lacasa y varias oxidasas productoras de  $H_2O_2$ . La purificación y caracterización de las fenoloxidasas y ligninasas incluye: especificidad de sustrato, estabilidad a diferentes pH y temperaturas, pH y temperatura óptimos. iii) Localización y estudio de los genes implicados en la ligninólisis. Actualmente se está procediendo a la búsqueda de los genes que codifican las fenoloxidasas y ligninasas mediante dos estrategias: a) Utilizando sondas heterólogas correspondientes a genes ya aislados y secuenciados en otros hongos degradadores de lignina. La presencia o ausencia en el genoma de los hongos seleccionados de secuencias homólogas se determinará por análisis Southern; b) Detección de los genes mediante el uso de oligonucleótidos sintetizados a partir de la secuencia parcial de la proteína purificada correspondiente.

Clones parciales o totales de dichos genes pueden aislarse a partir de DNA genómico de los correspondientes orga-

*compounds) and undefined media (which contain different types of lignin obtained through physical and chemical methods) to estimate the capacity of the fungi to utilize these synthetic compounds and/or lignins with different grades of alteration, as carbon sources. The monitorization of solid substrate degradation (wheat straw, bagasse, wood) was done with use of scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. ii) Enzymology. In the culture medium, enzymatic activities of lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase and several  $H_2O_2$  producing oxidases were assayed. The purification and characterization of the phenoloxidasas and ligninases include: substrate specificity, pH and temperature stability, optimum pH and temperature. iii) Localization and study of the genes involved in ligninolysis. Currently, the search for the genes of phenoloxidasas and ligninases is being carried out with two strategies: a) utilization of heterologous probes corresponding to the genes which have already been isolated and sequenced in other microorganisms. The presence or absence of homologous sequences in the genome of the fungi selected will be determined by Southern analysis. b) Detection of the genes through use of synthetic oligonucleotides from the partial sequence of the corresponding purified protein. Partial or total clones can be isolated from the genomic DNA of the corresponding organisms. In addition clones of cDNA will be constructed from mRNA obtained from cultures which express the gene, previously determined by Northern analyses, using the corresponding genomic clone as probe. Presently, characterization on molecular and functional levels will be initiated on the genes obtained.*

nismos. Asimismo, se aislarán clones de cDNA a partir de mRNA obtenido de cultivos que expresen el gen, previamente determinado por análisis Northern, usando el correspondiente clon genómico como sonda. Posteriormente se iniciará la caracterización a nivel molecular y funcional de los genes obtenidos.

Paralelamente, en colaboración con centros de Cuba y Chile, se han investigado otros sustratos (como el bagazo de caña de azúcar y el serrín de madera de *Pinus radiata* D. Don para la producción tanto de pulpa de papel como de enzimas ligninolíticas, mediante fermentación en estado sólido.

Finalmente se ha continuado, en cooperación con un grupo del CBM-CSIC, el trabajo para aislar y caracterizar hongos y levaduras que se desarrollan en ambientes extremos (microorganismos acidófilos y termófilos).

*Parallelly, in collaboration with centers in Cuba and Chile, other substrates (such as sugarcane bagasse and saw dust of Pinus radiata D. Don, have been investigated for the production of paper pulp and ligninolytic enzymes through solid state fermentation.*

*Lastly, we have continued investigation, with a group of CBM-CSIC, to isolate and characterize fungi and yeast which grow in extreme environments (acidophilic and thermophilic microorganisms).*

### **Científicos Invitados / Visiting Scientists**

- Orielle Alonso, Universidad Austral de Valdivia, Chile (X/XII-1994).
- María A. Brizuela, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (XII-1994).
- Miguel A. León, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (I-1993).

### **Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CICYT, BIO91-1281-CO3-01-CE (1991-1994)
- CICYT, BIO92-0357 (1992-1995)
- CICYT, BIO93-0662-CO4-01 (1993-1996)
- COST, bis 84 L103/23 (1990-1993)
- CE, Contract AGRE-CT90-0044-SMA (1991-1995)
- CE, Contract AGRE-CT90-0047-SMA (1990-1994)
- CAM, C104-91 (1991-1994)
- Convenio CSIC-ICC (International Center for Cancer & Development Biology-Chile)(1993-1995)
- Convenio Hispano-Cubano (CSIC-CECE) (1993-1995)

### **Colaboración con otras Instituciones / Working Collaborations with other Institutions**

- Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Alcalá de Henares; Instituto de Energías Renovables (IER), CIEMAT; Centro de Biología Molecular, CSIC, Universidad Autónoma de Madrid; Instituto de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral, Chile; Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar, La Habana, Cuba.

**Práctica de Estudio / Studienarbeit**

- Peter Knoblich. Untersuchung der Lignin-Peroxidase-, Mangan-Peroxidase- und Laccase-Aktivität bei den Weißfäulepilzen *Trametes versicolor* und *Phanerochaete chrysosporium*. Universität Karlsruhe, 1994.

**Publicaciones: / Publications**

- Bechtold, R., González, A.E., Almendros, G., Martínez, M.J. and Martínez, A.T.: Lignin alteration by *Ganoderma australe* and other White-rot fungi after solid-state fermentation of beech wood. *Holzforschung* 47, 91-96, 1993.
- Fidalgo, M.L., Terrón, M.C., Martínez, A.T., González, A.E., González-Vila, F.J. and Galletti, G.: Comparative study of fractions from alkaline extraction of wheat straw through chemical degradation, analytical pyrolysis, and spectroscopic techniques. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1621-1626, 1993.
- Pérez, V., De Troya, M.T., Martínez, A.T., González-Vila, F.J., Arias, M.E. and González, A.E.: *In vitro* decay of *Aeotoxicicon punctatum* and *Fagus sylvatica* woods by white and brown-rot fungi. *Wood Sci. Techn.* 27, 295-307, 1993.
- Terrón, M.C., Fidalgo, M.L., González, A.E., Almendros, G. and Galletti, G.C.: Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of different wheat straw fractions produced in the alkaline pulping process. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 27, 57-71, 1993.
- Terrón, M.C., Martín, C., Manzanares, P., Galletti, G.C. and González, A.E.: Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry of lignin from paper industry effluents decolorized by *Trametes versicolor*. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 7, 659-661, 1993.
- Borja, R. and González, A.E.: Comparison between anaerobic filter and anaerobic contact process for olive mill waste water previously fermented with *Geotrichum candidum*. *Proc. Biochemi.* 29, 139-144, 1994.

# VECTORES CEDIG

---

**MIGUEL VICENTE**

Responsable científico  
*Scientific supervisor*

**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.

En la actualidad se ha elevado el número de vectores incluidos en la base de datos PVTBASE hasta casi 400. Igualmente se ha recopilado información (como catálogos o bases de datos) sobre estirpes bacterianas y vectores recombinantes pertenecientes a Colecciones de cultivos internacionales: DSM (Alemania), ATCC (Estados Unidos), CECT (España), NCC y NCTC (Reino Unido), PhaBaGen (Holanda), VKPM (Rusia), y NCIMB (Bélgica). Con algunas de estas colecciones se ha establecido una colaboración de intercambio de datos.

PVTBASE se ha distribuido a todos los laboratorios colaboradores, y más tarde a los laboratorios que lo han pedido expresamente. Hasta el momento se han mandado unas 60 copias de esta base de datos, incluyendo laboratorios españoles, extranjeros y colecciones de cultivo internacionales.

En estos momentos, y dado el auge de las comunicaciones por red, estamos trabajando con el Centro de Cálculo de CSIC para introducir los datos de PVTBASE en el gopher de Pinar.

## Vectores CEDIG

*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.*

*The number of elements contained in the PVT database at this time amounts to nearly 400. Additional information on bacterial strains and recombinant vectors found in international culture collections has been compiled from their catalogues and databases. These include DSM (Germany), ATCC (USA), CECT (Spain), NCC and NCTC (United Kingdom), PhaBaGen (The Netherlands), VKPM (Russia), and NCIMB (Belgium). We maintain exchange agreements with some of them.*

*PVTBASE has been distributed both to the collaborating laboratories and to those which requested it. In total 60 copies of the database have been distributed to laboratories both in Spain and abroad, and to international culture collections.*

*Given the widespread use of network communications we are currently collaborating with the CSIC Central Computing Facilities to create a Gopher searchable database.*

*Additionally, in collaboration with the laboratory of Genetic Control of the Cell Cycle, we have distributed bacterial strains and vectors. In the past three years a total of 150 elements (80 strains and 70 vectors) have been distributed to several*



Por otra parte, en colaboración con el Laboratorio de Control Genético del Ciclo Celular, se han suministrado vectores y/o estirpes. Así en los últimos tres años se han efectuado 150 envíos (80 de estirpes y 70 de vectores) a distintos laboratorios españoles y extranjeros (50 españoles, 30 europeos y 10 a otros continentes).

A partir de 1994 hemos comenzado a editar un Boletín semestral que se distribuye a unos 300 laboratorios e Instituciones en España.

**Organismos Financiadores / Funding Agencies**

- CICYT BIO93-1317-E

*laboratories (50 in Spain, 30 in Europe and 10 elsewhere).*

*During 1994 we initiated the publication of a Bulletin which is distributed to 300 laboratories and Institutions in Spain.*



## Premios y Distinciones

### *Awards and Honours*

**José Antonio Abrisqueta Zarrabe.** Miembro del Consejo Asesor de la Revista Internacional Bilingüe «*Law and the Human Genome Review*»/«Revista de Derecho y Genoma Humano». Universidad de Deusto. Bilbao, 1994. Miembro del Comité Asesor Científico de la Revista para la FEISD (Federación Española de Instituciones para el Síndrome de Down).

**Pedro Castañera Domínguez.** Vicepresidente de la Organización Internacional para la Lucha Biológica e Integrada para el control de plagas. Octubre, 1993. Miembro del *Steering Committee of the International Pest Management Working Group* de la Unión Europea. Diciembre, 1993.

**José Ramón Díaz Ruiz.** Miembro del Consejo Editorial de la Revista «Virología», publicación oficial de la SEV, 1993 y 1994.

**Antonio de la Hera.** Miembro del Consejo Editorial de la Revista Inmunología. Miembro de la Comisión Nacional de Inmunología (Asesor de los Ministerios de Educación y Sanidad).

**Ernesto García López.** Presidente de la Asociación de Personal Investigador del CSIC, hasta Diciembre-1994.

**José Luis García López.** Gestor del Plan Nacional de Biotecnología de la CICYT.

**Santiago Lamas.** Premio Hospital 1994 de la Sociedad Española de Nefrología en Nefrología Experimental. Receptores: Saura, M., Escudero, E., Pérez de Lema, G., Arribas, I., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D. y Lamas, S.

**Víctor de Lorenzo Prieto.** Miembro del Consejo Editorial de *The Journal of Bacteriology*, 1989-1997. Miembro del Comité *ad hoc* de Expertos Gubernamentales de la OCDE en Biotecnología para un Medio Ambiente Limpio, 1992-1993. Miembro electo de la EERO (*European Environmental Research Organization*), 1994.

**Rubens López García.** Miembro del Consejo Editorial de *FEMS Microbiol. Lett.*

**Ana Mínguez Garrido.** Premio Extraordinario de Diplomatura y Licenciatura en Ciencias Biosanitarias. Universidad Complutense de Madrid, 1993.

**Flora de Pablo.** Miembro del Consejo Editorial de la revista *Comp. Biochem. Physiol.* 1994-1997.

**Eduardo Páez Abril.** Miembro del Consejo Editorial de la revista Virología (publicación oficial de la SEV).

**Fco. Javier Paz-Ares Rodríguez.** Miembro del Comité Editorial de la revista *The Plant Journal*.

**M.ª del Carmen Risueño Almeida.** Miembro del *Life Sciences Working Group of Microgravity Advisory Committee* de la Agencia Espacial Europea (ESA), desde Septiembre-1993.

**Pilar Sánchez Testillano.** Premio Extraordinario de Doctorado de la Universidad Complutense de Madrid, 1994.

**Consuelo de la Torre.** Miembro de la *European Science and Technology Assembly*. Organó asesor de la Comisión de la Unión Europea. Bruselas, 1994.

**Miguel Vicente.** Miembro del Consejo Editorial de la revista *World J. Microbiol. Biotech.* Miembro del Comité Científico Asesor de la revista «Fronteras» (CSIC).

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

**José Antonio Abrisqueta Zarrabe.** Coordinador del Simposio Internacional sobre «Perspectivas Actuales de la Genética Humana», patrocinado por la Fundación Ramón Areces. Madrid, 1993.

**Patricio Aller Tresguerres.** Director del Curso Monográfico de Doctorado «División y Diferenciación Celular». Departamento de Biología Celular, Universidad de Alcalá de Henares, y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 1992-1993 y 1993-1994.

**Carmelo Bernabeu Quirante.** Miembro del Comité Organizador del *12th European Immunology Meeting*. Barcelona, 1994.

**Ángela Casado Moragón.** Curso de Titulación Propia «Técnicas Inmuno hematológicas y Electroforéticas Básicas». Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense. Madrid, 1994. Curso «Teórico-Práctico de Técnicas Inmuno lógicas» del Gabinete de Formación del CSIC, con **Diana Carrascosa** y **Tomás Fontela Casado**, 1993.

**Ramón Díaz Orejas.** Co-organizador del *Workshop* del Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. *Molecular Biology and Ecology of Gene Transfer and Propagation Promoted by Plasmids*. Madrid, 1994.

**Aldo E. González Becerra.** 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. Directores: M.E. Arias y A. González, 1993.

**Paloma López García.** Co-organizadora *Second European Meeting on Molecular Biology of Pneumococcus*. Madrid, 1993.

**Rubens López, Pedro García y José Luis García.** Organizadores del *2nd European Meeting on Molecular Biology of Pneumococcus*. Madrid, 1993.

**Francisco Javier Medina.** Miembro del Comité Científico del «5.º Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular». Badajoz, 1993. Miembro del Comité Científico Internacional y Organizador del Mini *Symposium «Roles of Proteins in Nuclear Structure and Functions* del *4th European Congress on Cell Biology*. Praga, República Checa, 1994.

**Susana Moreno Díaz de la Espina.** Miembro del Comité Científico del «5.º Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular». Badajoz, 1993. Co-organizadora del Symposium «Organización Topológica de la Expresión Génica» del «6.º Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Biología Celular». México, 1994. Curso de Microscopía Electrónica para Biología y Medicina del Gabinete de Formación del CSIC. Plan de Formación Externa y Formación Permanente, 1993.

**Flora de Pablo.** Co-organizadora del *Workshop* del Instituto Juan March *Roles of Growth and Cell Survival Factors in Vertebrate Development*. Madrid, 1994. Directora del Curso de Doctorado «Factores de Crecimiento, Receptores y Mecanismos Bioquímicos Implicados en la Embriogénesis». Programa de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Complutense. Madrid, 1994.

**Eduardo Páez Abril.** Miembro del Comité Organizador del IV Congreso Nacional de Virología. 1994.

**Miguel Ángel Peñalva.** Organizador del *EMBO workshop On the Molecular Biology of Filamentous Fungi*. Palma de Mallorca, 1993.

---

**Juan M. Ramírez de Verger.** Tesorero. *8th European Bioenergetics Conference*. Valencia, 1994.

**Eduardo Rial Zueco.** Secretario Comité Organizador de la *8th European Bioenergetics Conference*. Valencia, 1994.

**M.ª del Carmen Risueño.** Organizadora del "V Congreso Nacional de la Sociedad Española de Biología Celular" (SEBC). Badajoz, 1993. Organizadora del *Workshop Male Gametophyte Development*, en el *13th International Congress on Sexual Plant Reproduction*. Viena, Austria, 1994. Organizadora del *Workshop Nuclear Compartments Studied by Different Microscopy Approaches* en el *13th International Congress on Electron Microscopy*. Paris, Francia, 1994.

**Lucas Sánchez Rodríguez.** Director de los Cursos de Doctorado «Citogenética Molecular» y «Genética del Desarrollo». Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, 1992-1993 y 1993-1994.

**Consuelo de la Torre.** Miembro del Comité Internacional del *13th. European Workshop on the Cell Nucleus*. Balatonliga, Hungría, 1993.

**Consuelo de la Torre y Gonzalo Giménez Martín.** Curso de Postgrado «Proliferación Celular. Aplicación a la Evaluación de la Genotoxicidad Ambiental». Dpto. de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México D.F. 1994. Curso de Postgrado *Proliferação Celular: Aplicação na Avaliação da Genotoxicidade Ambiental*. Universidad Estadual de Maringá, Brasil, 1994.

**Eduardo Torroja Cavanillas.** Profesor Honorario de la Universidad Autónoma de Madrid, asignatura: "Genética de Poblaciones y Evolución", Cursos Académicos: 1992-1993 y 1993-1994.

---

## Seminarios del Centro

### Seminars

1993

**Dr. Balbino Alarcón**, Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid, España.

Multifuncionalidad de una secuencia que contiene tirosina en el complejo TCR/CD3.

**Dr. Pedro Aparicio**, Dpto. de Bioquímica e Inmunología, Universidad de Murcia, España.

Cambios morfológicos de linfocitos T y B inducidos por el crosslinking de moléculas con actividad co-estimuladora.

**Dr. Fernando Azorín**, Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC, Barcelona, España.

Polimorfismo estructural del DNA: estructura y función de las secuencias d(GA.CT)<sub>n</sub>.

**Dr. Fernando Baquero**, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España.

Ecología microbiana y salud pública.

**Dr. Mariano Barbacid**, Bristol-Mayers Squibb Research Institute, Princeton, NJ, USA.

*From oncogenes to proto-oncogenes.*

**Dra. Alicia Bárcena**, University of California, Berkeley, USA.

Caracterización de precursores de células T en el hígado y timo fetal humano.

**Dr. David Baulcombe**, The Sainsbury Laboratory, Norwich, U.K.

*The molecular biology of virus resistance in plants. Case histories based on potato virus X.*

**Dr. Alfredo Berzal**, University of Vermont, School of Medicine, Vermont, USA.

Corte, ligación y polimerización de RNA catalizado por ribozimas.

**Dr. Michel Caboche**, Institute Nationale de la Recherche Agronomique, Versailles, Francia.

*Molecular analysis of nitrate assimilation in solanaceous species.*

**Dr. Mariam Carlson**, College of Physicians & Surgeons of Columbia University, New York, NY, USA.

*Transcriptional control in yeast: the SNF1 kinase pathway and glucose repression.*

**Dr. Thomas E. Creighton**, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania.

*Experimental studies of protein folding and biosynthesis.*

**Dr. K. Dellagi**, Pasteur Institute in Tunisia, Túnez.

*Epidemiological and immunological studies on Leishmaniasis in Tunisia.*

**Dr. C. G. Dosoretz**, MIGAL, Galilei Technological Center, Israel.

*Overproduction of the lignolytic system of phanerochaete chysosporium under non-limiting nutrient conditions.*

**Dr. Alberto Ferrús**, Instituto Santiago Ramón y Cajal, CSIC, Madrid, España.

¿Hay una determinación genética de la fisiología sináptica?

**Dr. Paul Galland**, Departamento de Genética, Universidad de Salamanca, España.

*The role of pteridins and flavins in the photoreception of phycomyces and euglena.*

**Dr. Susan Gasser**, Swiss Institute for Experimental Cancer Research, ISRREC, Lausanne, Suiza.  
*RAP1 and the subnuclear organization of yeast chromosomes.*

**Dr. Ernest Giralt**, Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.  
Péptidos y reconocimiento molecular.

**Dr. Regine Hakenbeck**, Max-Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Alemania.  
*Links between transformation and penicillin resistance in pneumococci.*

**Dr. Birgit Kessler**, National Biotechnology Center, Braunschweig, Alemania.  
*Transcriptional regulation of toluene biodegradation in pseudomonas putida (PWWO).*

**Dr. Peter Kim**, Whitehead Institute for Biomedical Research, MIT, Cambridge, MA, USA.  
*Protein folding, leucine zippers and a spring-loaded protein.*

**Dr. Bernard Kurek**, Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles, INRA, Paris-Grignon, Francia.  
*On the role of peroxidases in lignin biodegradation.*

**Dr. Derek LeRoith**, NIH, Bethesda, MD, USA.  
*Regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression.*

**Dr. Alvaro Martínez del Pozo**, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, España.  
Estudio de las bases moleculares de la citotoxicidad de la Ifasarcina.

**Dr. José M. Martínez Zapater**, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid, España.  
Control genético de la transición floral en *arabidopsis thaliana*.

**Dr. Fritz Melchers**, Basel Institute for Immunology, Basel, Suiza.  
*Molecular steps and cellular stages of B cell development.*

**Dr. Anthony Moore**, University of Sussex, Brighton, U.K.  
*Regulation of electron transport in branched respiratory chains.*

**Dr. Ronald N. Morris**, NJ University of the Health Sciences, Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ, USA.  
*Aspergillus as a model organism for studying cell biology.*

**Dr. Thomas Nyström**, University of Göteborg, Suecia.  
*How to keep alive in a hostile environment: role and regulation of a universal stress response in E.Coli.*

**Dra. Montserrat Pagés**, Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC, Barcelona, España.  
Genes de maíz regulados por ácido abscisico y estres hídrico.

**Dr. Juan Luis Ramos**, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España.  
Microorganismos recombinantes en el medio ambiente: seguimiento, retrotransferencia y auto-suicidio.

**Dr. Javier Sancho**, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, España.  
Estudios de la estabilidad y ruta de plegamiento de una proteína modelo: Barnasa.

**Prof. Severo Ochoa**, Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid, España.  
La emoción de descubrir.

**Dr. Jean-Christophe Renauld**, Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Bélgica.

*Interleukin-9: a T cell growth factor with a potential oncogenic activity.*

**Dr. Tsunao Saitoh**, University of California, San Diego, CA, USA.

*Aberrant signal transduction in Alzheimer's disease.*

**Dr. Victoria Shingler**, University of Umea, Suecia.

*Genetic and biochemical dissection of phenol biodegradation by pseudomonas.*

**Dr. Nikolay Sjakste**, Institut Jacques Monod, Université Paris, Paris, Francia.

*DNA-protein interactions in the chromatin domains of vegetal and animal cells.*

**Dr. David Spector**, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA.

*Coordination of transcription and pre-mRNA splicing within the cell nucleus.*

**Dr. William Studier**, Brookhaven National Laboratory, Upton, LI, NY, USA.

*DNA sequencing by primer walking with strings of contiguous hexamers.*

**Dr. Ignacio Torres Alemán**, Instituto Cajal. CSIC, Madrid, España.

*Mecanismos celulares de plasticidad neuronal mediados por IGF-I.*

**Dr. Greg Winter**, Centre for Protein Engineering, Cambridge, U.K.

*Making human antibodies using phage display technology.*

## 1994

**Dr. Richard D'Ari**, Institut Jacques Monod CNRS, Paris.

*Cell shape, cell division and ppGpp in E. coli.*

**Dr. Jon Beckwith**, Harvard Medical School, Department of Microbiology & Molecular Genetics, Cambridge, MA, USA.

*Pathways of disulphide bond formation in proteins in vivo.*

**Dr. Rolf Bernander**, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Noruega.

*Coordination between chromosome replication and cell division in E. Coli.*

**Dr. Martin Brand**, University of Cambridge, Department of Biochemistry, Cambridge, UK.

*Mitochondrial proton cycling in liver and muscle as a major source of metabolic heat.*

**Dr. Josep Casadesus**, Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

*Efectos pleiotrópicos de la superproducción de proteínas HisH e HisF en Salmonella Typhimurium: Osmosensibilidad, termosensibilidad e inhibición de la división celular.*

**Dra. Guadalupe Ciprés**, Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, USA.

*Alanine-Scanning Mutagenesis of Human Transcription Elongation factor TFIIIS.*

**Dr. Umberto Dianzani**, Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, Italia.

*CD73 and CD38: Two accessory molecules with a selective function on human naive T cells.*

**Dr. Argiris Efstratiadis**, Columbia University, Department of Genetics and Development, New York, NY, USA.  
*Insulin-like growth factors and dwarf mice: the genetic and epigenetic control of embryonic growth.*

**Dr. Michael Ehrmann**, University of Konstanz, Alemania.  
*Studies on translocation and topology of cytoplasmic membrane proteins of Escherichia Coli.*

**Dr. René Etcheberrigaray**, NIH, Bethesda, Maryland, USA.  
Mecanismos moleculares de la memoria: Implicaciones para la enfermedad de Alzheimer.

**Dr. Raúl Fernández Donoso**, Universidad de Chile.  
Asociaciones de cromosomas y de bivalentes en *Mus domesticticus*. Predecibilidad y consecuencias.

**Dr. Siegmund Fischer**, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, INSERM, Paris, Francia.  
*Activation and regulation of p56lck, a T lymphocyte specific protein tyrosine kinase.*

**Dr. Teizo Fujita**, Fukushima Medical College, Department of Biochemistry, Fukushima, Japón.  
*Molecular characterization of MASP which is involved in activation of a novel complement pathway.*

**Dr. Norbel Galanti**, Universidad de Chile.  
Proteínas cromosomales y cromatina en *Trypanosoma*.

**Dr. Alphonse García**, Institut Pasteur, París, Francia.  
*HIV: Kinases, phosphatases and signal transduction.*

**Dr. Rafael Giraldo Suárez**, Medical Research Council, Cambridge, UK.  
Estudios funcionales y estructurales sobre RAP1, una «chaperona» en la formación de *DNA cuadruplexes*.

**Dr. Donald R. Helinski**, Center for Molecular Genetics, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA.  
*DNA-protein interactions in the replication and stable maintenance of a broad-host range plasmid.*

**Dr. Michelle Letarte**, The Hospital for Sick Children, Division of Immunology & Cancer Research, Toronto, Canada.  
*Update on Endoglin.*

**Dr. Roy Lobb, Biogen**, Cambridge, MA, USA.  
*Recent studies on the VCAM-1/VLA-4 adhesion pathway.*

**Dr. H.-D. Lüdemann**, Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie, Regensburg, Alemania.  
*Recent applications and perspectives of nuclear magnetic resonance of biological materials: 15N-NMR in natural abundance.*

**Dr. Bernard Malissen**, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, CNRS, Marseille, Francia.  
*Molecular dissection of the transducing subunits of the T cell antigen receptor using CD3-z and CD3-e deficient mice.*

**Dra. Antonia Martín Gallardo**, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, España.  
*Caracterización molecular de regiones subteloméricas del cromosoma humano 19.*

**Dr. Oscar Vicente Meana**, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Wien Universität, Viena, Austria.  
Inducción de embriogénesis en cultivos de polen aislados de tabaco.

**Dr. Allen P. Milton**, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

*Effects of macromolecular crowding, confinement, and stickiness on protein associations, structure and stability in vivo.*

**Dr. Sergio Moreno**, Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC, Universidad de Salamanca, España.

Regulación de la fase G1 del ciclo celular.

**Dr. Roger Perlmutter**, University of Washington School of Medicine, Dept. of Immunology, Seattle, WA, USA.

*Control of lymphocyte development by non-receptor protein tyrosine kinases.*

**Dr. Martin Raff**, Medical Research Council, University College, London, UK.

*The «Ins» and «Outs» of programmed cell death.*

**Dr. Klaus Rajewsky**, Institut für Genetik der Universität zu Köln, Köln, RFA.

*Gene targeting as a tool in developmental biology and medical research.*

**Dr. Joaquim Roca**, Harvard University, USA.

Mecanismo y función de las topoisomerasas del DNA de tipo II.

**Dr. Jan Roelof Van der Meer**, EAWAG-ETH, Zurich, Suiza.

*Molecular mechanisms of genetic adaptation in bacteria to chlorinated aromatic compounds.*

**Dr. Miguel A. de la Rosa**, Instituto de Bioquímica vegetal y Fotosíntesis, CSIC, y Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

Estructura y función de proteínas donadoras y aceptoras de electrones del fotosistema I.

**Dr. Antonio Romero**, Instituto Rocasolano, CSIC, Madrid, España.

Proteínas de transferencia electrónica: análisis tridimensional.

**Dr. Clarence A. Ryan**, Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA, USA.

*The signaling pathway for systemin, a mobile signal for plant defensive genes.*

**Dr. Iñigo Saenz de Tejada**, Boston University, USA.

Biochemical regulation of penile erection : Implications for nitric oxide.

**Dr. Rafael Salto**, University of California San Francisco Medical School, San Francisco, CA, USA.

Inhibidores de proteasas del virus del sida (HIV) de interés terapéutico.

**Dr. Lucas Sánchez**, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

Determinación sexual y compensación de dosis génica en *Drosophila melanogaster*: regulación del gen *sex-lethal*.

**Dr. Pedro Santamaría**, Centre de Génétique Moléculaire du CNRS, Gif-sur-Yvette, Francia.

Caracterización de *multisexcombs*, un gen del grupo *polycom* de *Drosophila* que funciona como supresor en tumores.

**Dr. Pierre Scarmato**, CNRS, Villejuif, Francia.

*CD4 interaction site with class II HLA molecules and the HIV envelope glycoprotein gp120.*

**Dr. J. Schell**, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, Alemania.

*Plant growth factors and their mechanism of action.*

**Dr. Luis Serrano**, EMBL, Heidelberg, Alemania.

Predicción del comportamiento estructural de péptidos monoméricos en solución.



---

**Dr. Francesco Sinigaglia**, Roche Milano Ricerche, Milan, Italia.

*The molecular basis of peptide-MHC class II interaction.*

**Dr. Salvatore Turco**, University of Kentucky College of Medicine, Department of Biochemistry, Kentucky, USA.

*The hypophosphoglycan of Leishmania parasites: Multifunctional virulence factor.*

Agradecemos a las siguientes casas comerciales su contribución a financiar los seminarios durante estos dos años:

1993: **AFORA; Distribuidora Europa; IZASA; LAB-CENTER.**

1994: **AFORA, S.A.; Cultek, S.L.; Distribuidora Europa; LAB-CENTER, S.L.; Millipore Ibérica, S.A.; PACISA.**

---

# Personal de los Servicios del Centro

## Dirección y Gerencia

Director:

**Guillermo Giménez Gallego**

(Desde X-1993)

Director en funciones:

**Manuel Espinosa Padrón**

(Hasta X-1993)

Vicedirectores

**Concepción García Mendoza** (Desde X-1993)

**Rubens López García** (Desde X-1993)

Vicedirector en funciones:

**Aldo González Becerra** (Hasta X-1993)

Gerente:

**Germán Lerma Rodrigo** (Desde XI-1993)

**Elena Cuesta Romero** (Hasta XI-1993)

Secretaría:

**Ana Chao Vázquez**

**Luis García Trujillo**

## Administración

**Ángel Abril Novella** (Desde III-1994)

**Domingo Arranz Escudero** (Hasta V-1993)

**Julia Anades Besnard** (Desde VI-1993)

**Margarita Fernández García**

**Nieves González Esteban** (Desde VI-1993)

**Reyes Llaguno Pérez** (Hasta IV-1994)

**Esther Escribano Arranz** (Hasta XI-1993)

**Estrella González Herradura**

**Natividad Gutiérrez García**

## Almacén y Compras

**Ramón Serrano Coronado** (Jefe de Servicio)

**Gregorio Bodega Muñoz**

**Purificación de Chorro de Villaceballos**

**Manuel Pérez Cabría** (Desde I-1994)

**Ezequiel Toribio Toribio**

**José Cleto Carnero Santas** (Hasta I-1994)

**Celia López Adsuara**

**M.<sup>a</sup> Teresa Ramos Jiménez**

## Animalario

**Diego Díaz Izquierdo**

**Fco. José García González** (Desde III-1993)

**Gabino García Amaya**

**Manuel Moreno Calle**

**Biblioteca y Reprografía**

**Evencio Cabrerizo de las Heras**  
**Manuel Fernández Amor** (Hasta II-1994)  
**Ángel Gutiérrez Sanz**  
**Concepción López Hermida**  
**M.ª Jesús Vilela Manrique**

**Esperanza Cabrero Alonso-M.**  
**M.ª Jesús Garabito Seco** (Desde II-1994)  
**M.ª Antonia Hermida González**  
**J. Miguel Soto Estébanez**

**Citofluorimetría**

**Pedro Lastres Varo**

**Comedor**

**Julia Anades Besnard** (Hasta VI-1993)  
**Encarnación Sánchez Ruiz**

**Enriqueta Arévalo García** (Hasta II-1993)  
**Felina Somolinos García**

**Conserjería, Fax y Franqueo**

**Florentino Flor Fernández**  
**Lucía González Díaz** (Desde V-1994)  
**Julian López Ramírez**  
**Lorenzo Montero Vera**  
**Julian Romero Orihuela**

**Diego García Herraz**  
**José M. Gordillo Rodríguez**  
**Juan M. Martín Sierra**  
**Domingo Muriel Muñoz**

**Cromatografía**

**Alicia Prieto Orzanco**

**Cultivo de Tejidos**

**Alejandra Martín Ruiz**  
**Blanca Pérez Maceda**

**Esterilización y Medios**

**Matilde Delgado Cebrián** (Hasta VIII-1993)  
**Carmen Días-Amado Cavanillas**  
**Rosa Díaz López** (Desde X-1993)

**Fotografía y Delineación**

**José Blanco Marcos**  
**Aurelio Hurtado Caro**

**Rosa Díaz López** (Hasta X-1993)  
**Ricardo Uña Marín**

**Informática**

**José Manuel Angulo Zapatero**

### **Limpieza Material y Lavandería**

**Elisa Ballesteros Villamayor**  
**Juana Encabo de Blas (Hasta V-1994)**  
**Sala Fuentes Romero**  
**María Jiménez Contreras**  
**Carmen López Castellanos**  
**Isabel López Romera**  
**Bárbara Moreno Jiménez**  
**Soledad Pastor Encabo**

**Blasa Carrión Fernández**  
**Purificación Fernández Ortiz**  
**Remedios Galán Iglesias**  
**Felicidad Lara Martínez**  
**María López Ramírez**  
**Luisa Meseguer Fabregat**  
**Piedad Otazo Castromonte (Hasta IV-1994)**  
**Francisca Valle Rubio**

### **Microscopía Electrónica**

**Eloy Blanco Marcos (Hasta VII-1993)**  
**Juana González Arribas**  
**M.ª Ángeles Ollacarizqueta**

**José Ramón Díaz Bueno (Desde VIII-1994)**  
**M.ª Dolores Guirao Rey**

### **Modelado de Proteínas**

**Mario García Lacoba**

### **Química de Proteínas**

**Javier Varela Espinosa**

### **Radiactividad**

**Marta Cebrián Echarri**

### **Servicio Técnico**

**Antonio García Álvarez (Jefe de Servicio)**

**Lorenzo Alonso Macarrón,**  
**José Cabañas Olivares**  
**José Fernández Fernández**  
**Sebastián Hijosa García (Hasta V-1994)**  
**Fco. Javier Manzano López**  
**Antonio Pérez Pardo**  
**Juan Miguel Tijero Páramo**  
**Manuel Ramón Toro Monsalve**  
**Paloma Velasco de la Roca**

**Ángel Arranz Bombín**  
**Gregorio Cano Martín (Hasta I-1994)**  
**Delfín González Hernández**  
**Yolanda Jiménez Sanz (Desde XI-1994)**  
**Angel Pacheco del Olmo**  
**José Santiago Rojo**  
**Francisco Tirado Amarilla (Desde I-1994)**  
**Antonio Vallejo Domínguez**

### **Vectores CEDIG**

**M.ª Ángeles Sacristán Martín**

# Jubilaciones y Nuevas Incorporaciones de Personal

## **Personas que se han jubilado durante estos dos años:**

### **Investigadores:**

Ramona Beltrá Martínez de Velasco  
Pilar Alonso Sanjuán  
M.<sup>a</sup> del Carmen García Fernández  
Carmen Gil Fernández  
Aurora González Fernández  
Monique Novaes Leducu

### **Ayudantes de Investigación:**

Enriqueta Arévalo García  
Antonia Conde Viced  
Sacramento Peñalver Espino

### **Personal Laboral:**

Gregorio Cano Martín  
Juana Encabo de Blas  
Manuel Fernández Amor  
Piedad Otazo Castromonte

## **Personas que se han incorporado durante estos dos años:**

### **Investigadores:**

Santiago Lamas Pelaez  
Enrique de la Rosa Cano  
Javier Rey Campos

### **Titulado Técnico Especializado:**

M.<sup>a</sup> Ángeles Sacristán Martín

### **Ayudantes de Investigación:**

Ángel Abril Novella  
Nieves González Esteban

### **Personal Administrativo:**

Yolanda Jimenez Sanz

### **Personal Laboral:**

Fernando Escolar  
José Ramón Díaz Bueno  
Rosa Díaz López  
M.<sup>a</sup> Jesús Garabito Seco  
Fco. José García González  
Lucía González Díaz  
Juan M. Martín Sierra  
Manuel Pérez Cabria  
Francisco Tirado Amarilla

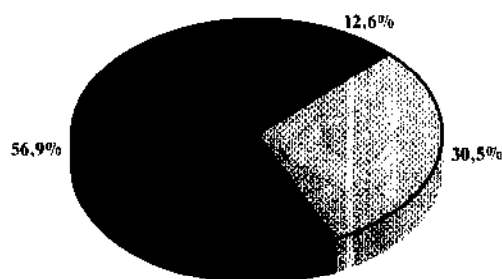
# RESUMEN DE DATOS ECONÓMICOS

## PRESUPUESTO DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS 1993-94<sup>a</sup>

Presupuesto ordinario	94.810	94.958	100
Inversiones	66.265	80.752	122
Apoyo a Infraestructura	62.092	86.774	140
Explotación del Comedor	15.839	18.564	117
<b>Total Infraestructura del Centro</b>	<b>239.006</b>	<b>281.048</b>	<b>118</b>
Proyecto CICYT, DGICYT y CAM	281.722	383.678	136
Proyectos FIS y contratos con empresas	90.795	135.768	150
Programas de la Unión Europea	203.849	142.408	70
<b>Total Proyectos y Contratos</b>	<b>576.364</b>	<b>661.854</b>	<b>115</b>
Personal	1.075.504	1.089.829	101
<b>TOTAL</b>	<b>1.890.874</b>	<b>2.032.731</b>	<b>108</b>

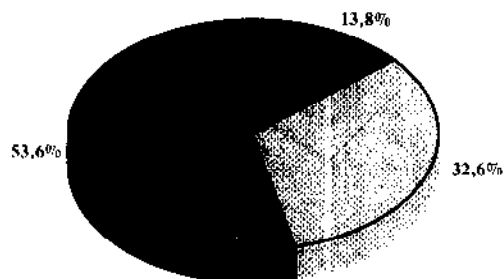
a- En Miles de Pesetas  
b- Considerando 100 el valor para 1993

1993



Total en miles de Pesetas:  
1.890.879

1994



Total en miles de Pesetas:  
2.032.735

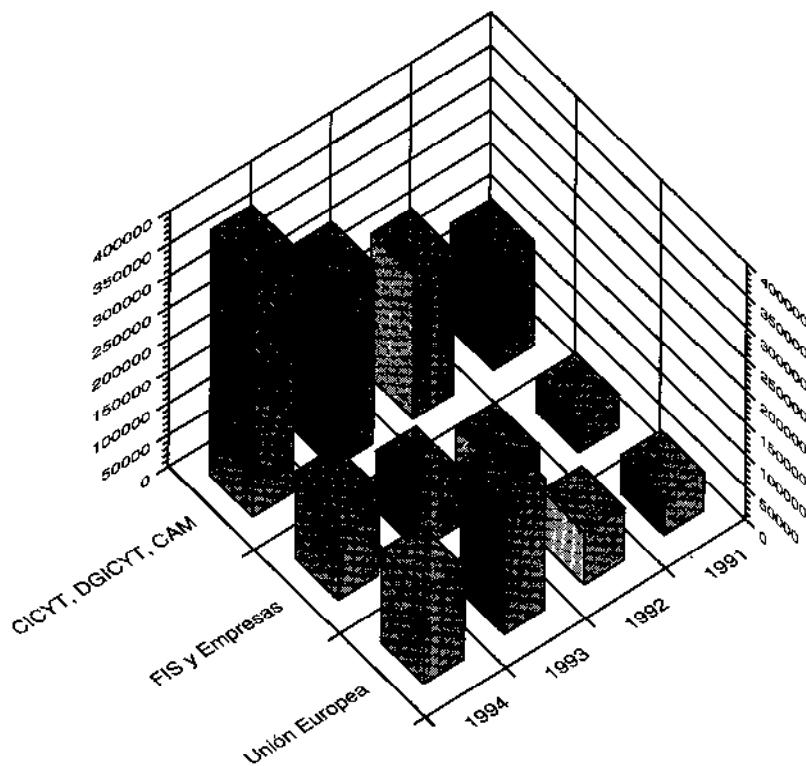
PRESUPUESTO TOTAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

**FINANCIACION OBTENIDA POR LOS PROYECTOS DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLOGICAS\***

<b>Proyectos CICYT, DGICYT y CAM</b>	163.670	224.524	137	281.722	172	383.678	234
<b>Programas de la Unión Europea</b>	60.749	81.423	134	205.849	336	142.408	234
<b>IOIV</b>	3.695	7.102	176	8.367	76	191.855	302

a- En Miles de Pesetas

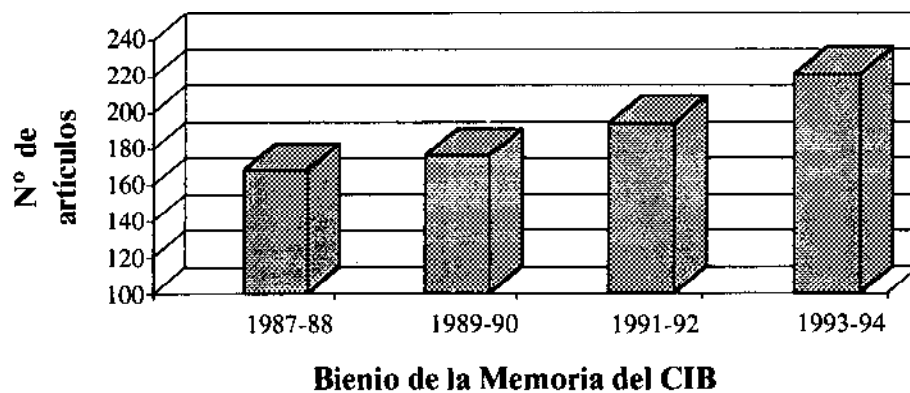
b- Considerando 100 el valor para 1991



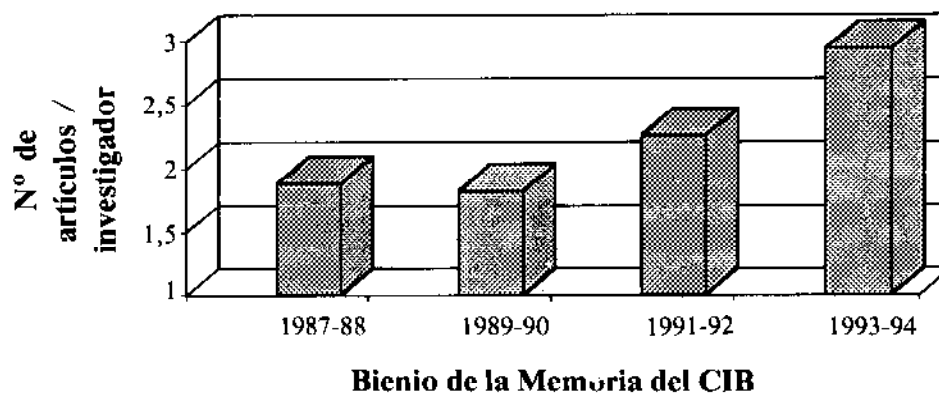
**Financiación de Proyectos en Miles de Pesetas**

# EVOLUCIÓN DEL NÚMERO DE PUBLICACIONES Y SU IMPACTO

**Evolución del número de artículos en el SCI\* por bienio**

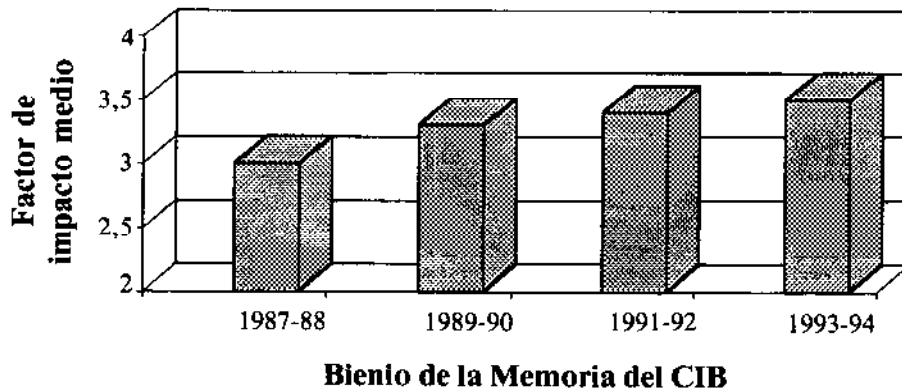


**Evolución del número de artículos en el SCI\* por investigador**

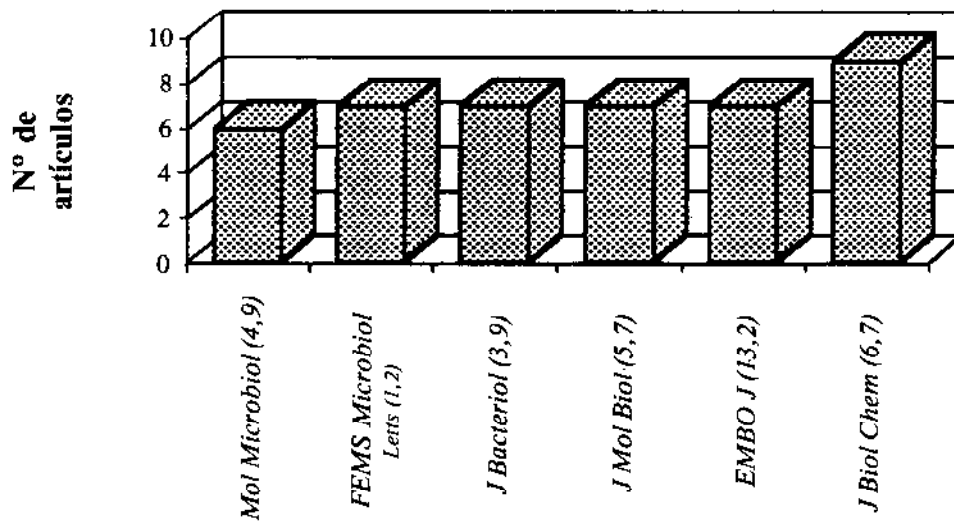




### Evolución del Factor de Impacto medio de las revistas utilizadas



### Revistas en las que los investigadores del CIB publicaron más frecuentemente en 1993-94 (y su factor de impacto en 1993)

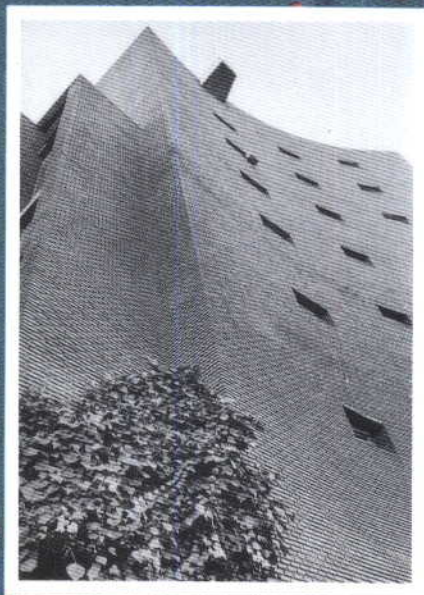


# Índice de Investigadores Actuales en Plantilla

Nombre	Escala	Teléfono
Aller Tresguerres, Patricio	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1979) 4247
Andreu Morales, J. Manuel	Profesor I.	(Dr. Bioquímicas, 1976) 4381
Aparicio Alonso, Pedro J.	Profesor I.	(Dr. Farmacia, 1971) 4363
Barasoain Blasco, Isabel	Colaborador C.	(Dra. C. Biológicas, 1976) 4216
Bernabéu Quirante, Carmelo	Investigador C.	(Dr. C. Químicas, 1977) 4246
Botella Cubells, Luisa M. <sup>a</sup>	Colaborador C.	(Dra. C. Biológicas, 1981) 4312
Cánovas Palacio-Valdés, José L.	Profesor I.	(Dr. Farmacia, 1964) 4227
Casado Moragón, Angela	Colaborador C.	(Dra. C. Biológicas, 1962) 4219
Castañera Domínguez, Pedro	Profesor I.	(Dr. Ing. Agrónomo, 1981) 4264
De La Hera Martínez, Antonio	Colaborador C.	(Dr. Medicina, 1986) 4394
De la Rosa Cano, Enrique	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1984) 4274
De La Torre García-Quintana, Consuelo	Profesor I.	(Dra. Farmacia, 1969) 4307
De Lorenzo Prieto, Victor	Colaborador C.	(Dr. C. Químicas, 1983) 4243
De Pablo Dávila, Flora	Investigadora C.	(Dra. Medicina, 1979) 4360
De Torrontegui Pico de Coaña, Gertrudis	Investigadora C.	(Dra. Ciencias, 1963) 4348
Del Mazo Martínez, Jesús	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1978) 4324
Díaz Orejas, Ramón	Investigador C.	(Dr. C. Químicas, 1976) 4351
Díaz Ruiz, J. Ramón	Profesor I.	(Dr. Farmacia, 1971) 4406
Espinosa Padrón, Manuel	Profesor I.	(Dr. Ciencias, 1969) 4209
Esponda Fernández, Pedro	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1979) 4336
Fernández Gómez, M. <sup>a</sup> Encarnación	Investigadora C.	(Dra. C. Químicas, 1966) 4257
Fernández-Tresguerres, M. <sup>a</sup> Elena	Colaboradora C.	(Dra. Farmacia, 1971) 4353
García González, Pedro	Colaborador C.	(Dr. C. Químicas, 1982) 4428
García Hermida, Ofelia	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1975) 4355
García López, Ernesto	Profesor I.	(Dr. C. Biológicas, 1974) 4428
García López, J. Luis	Investigador C.	(Dr. C. Químicas, 1980) 4418
García Luque, Isabel	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1983) 4410
García Mendoza, Concepción	Investigadora C.	(Dra. Farmacia, 1964) 4262
García Pardo, Ángeles	Colaboradora C.	(Dra. C. Químicas, 1976) 4430
Giménez Gallego, Guillermo	Profesor I.	(Dr. C. Biológicas, 1977) 4378
Goday Baylina, Clara	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1980) 4314
Gómez Alarcón, Gonzalo	Colaborador C.	(Dr. Farmacia, 1976) 4269
González Becerra, Aldo	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1986) 4414
Gutiérrez Rueda, Carmen	Colaboradora C.	(Dra. Farmacia, 1962) 4386
Hernández Valenzuela, Pablo	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1984) 4232
Jareño Cañada, M. <sup>a</sup> Asunción	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1968) 4395
Krimer Smunis, Dora Beatriz	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1979) 4238
Lamas Peláez, Santiago	Colaborador C.	(Dr. Medicina, 1989) 4302
Larraga Rodríguez de Vera, Vicente	Profesor I.	(Dr. C. Biológicas, 1974) 4207

Leal Ojeda, J. Antonio	Investigador C.	(Dr. Farmacia, 1965)	4437
López Abella, Dionisio	Profesor I.	(Dr. C. Biológicas, 1977)	4404
López García, Paloma	Investigadora C.	(Dra. C. Biológicas, 1978)	4203
López García, Rubens	Profesor I.	(Dr. C. Biológicas, 1966)	4428
Marquet Espinosa, Alberto	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1974)	4245
Martín González Antonio	Investigador C.	(Dr. C. Químicas, 1966)	4436
Martín Requero, M. <sup>a</sup> Ángeles	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1978)	4224
Martínez Ferrer, Ángel T.	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1976)	4407
Martínez Hernández, M. <sup>a</sup> Jesús	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1980)	4439
Medina Díaz, F. Javier	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1979)	4261
Moreno Díaz De La Espina, Susana	Colaboradora C.	(Dra. C. Biológicas, 1975)	4257
Parrilla Sánchez, Roberto	Profesor I.	(Dr. Medicina, 1968)	4204
Páez Abril, Eduardo	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1981)	4387
Peñalva Soto, Miguel A.	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1982)	4358
Pérez Ureña, M. <sup>a</sup> Teresa	Investigadora C.	(Dra. Farmacia, 1961)	4210
Ramírez De Verger, Juan M.	Profesor I.	(Dr. C. Químicas, 1965)	4369
Reyes Ramírez, Fuensanta	Investigadora C.	(Dra. C. Químicas, 1964)	4441
Rey Campos, Javier	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1986)	4416
Rial Zueco, Eduardo	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1984)	4236
Risueño Almeida, M. <sup>a</sup> Carmen	Investigadora C.	(Dra. C. Biológicas, 1967)	4230
Rivas López, Luis	Colaborador C.	(Dr. C. Químicas, 1984)	4234
Robles Chillida, Elías M.	Colaborador C.	(Dr. Farmacia, 1969)	4275
Rodríguez de Córdoba, Santiago	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1981)	4432
Rodríguez Murcia, Carlos	Investigador C.	(Dr. Veterinaria, 1962)	5627622
Rojo Hernández, José M. <sup>a</sup>	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1978)	4217
Sánchez Ayuso, Matilde	Investigadora C.	(Dra. C. Químicas, 1969)	4225
Sánchez Rodríguez, Lucas	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1976)	4322
Schwartzman Blinder, Bernardo	Colaborador C.	(Dr. Ing. Agrónomo, 1978)	4233
Serra Yoldi, M. <sup>a</sup> Teresa	Colaboradora C.	(Dra. Farmacia, 1971)	4411
Silva González, Augusto	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1981)	4431
Teixidó Calvo, Joaquín	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1985)	4392
Torroja Cavanillas, Eduardo	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1962)	4323
Vicente Muñoz, Miguel	Investigador C.	(Dr. C. Biológicas, 1972)	4375
Vidal Caballero, Miguel A.	Colaborador C.	(Dr. C. Biológicas, 1984)	4382
Vilas Minondo, Pilar	Investigadora C.	(Dra. Farmacia, 1964)	4391

(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. VELAZQUEZ 144 - 28006 MADRID