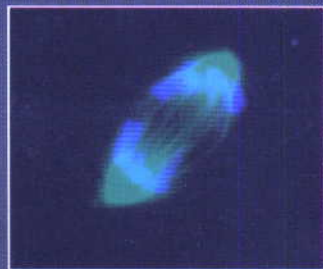
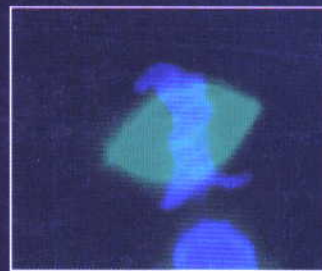
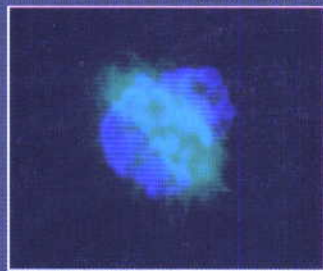


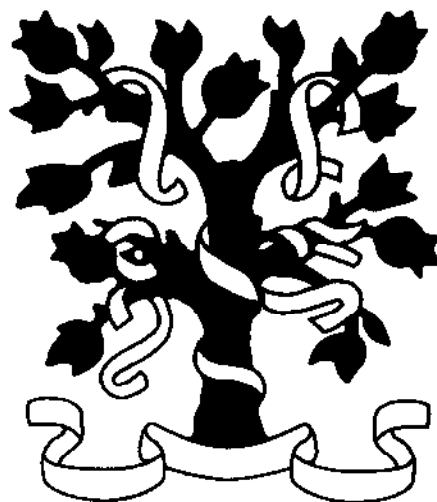
Centro de Investigaciones Biológicas

1995/1996



MEMORIA CIENTÍFICA 1995/1996

Centro de Investigaciones Biológicas



CSIC

Velázquez, 144 - 28006 Madrid, España

Teléfono: (341) 564-4562 ó 561-1800

Fax: (341) 562-7518

Con la colaboración de

ANAYA

Cubierta
Cover

Fotografía derecha

Resistencia transgénica frente al tobamovirus del moteado suave del pimiento mediada por la replicasa viral. La fotografía presenta un grupo de plantas de *Nicotiana benthamiana*, transformadas con una secuencia del gen de la replicasa del virus, mostrando resistencia completa frente a la infección viral (arriba), en comparación con otro grupo de plantas transgénicas mostrando resistencia (centro) y un grupo de plantas control mostrando los síntomas severos de la enfermedad (abajo). Laboratorio de Virología Molecular de Plantas, Tenllado *et al.*, *Virology* 211, 170-183, 1995.

Right picture

Replicase-mediated transgenic resistance against the pepper mild mottle tobamovirus. The picture presents a group of Nicotiana benthamiana plant, transformed with a sequence of the viral replicase gene, showing complete resistance against the viral infection (up), in comparison with another group of transgenic plants showing delayed resistance (center) and a group of control plants showing the severe disease symptoms (down). Plant Molecular Virology Laboratory, Tenllado et al., Virology 211, 170-183, 1995.

Fondo: Estatua sita en el edificio del CIB

Recuadro: Husos mitóticos de células PtK2 visualizados directamente (en verde) con la sonda fluorescente de microtúbulos 7-(N-fluorescein-L-alanyl) taxol (Souto *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 2710-2712, 1996). La cromatina se ha teñido con Hoechst 33342 (azul). Profase tardía, metafase, anafase y telofase (I. Barasoain y M. Abal).

Background: Sculpture located at the CIB building

Insert: Mitotic spindles of PtK2 cells directly visualized (in green) with the fluorescent microtubule probe 7-N-fluorescein-L-alanyl) taxol (Souto *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 2710-2712, 1996). Chromatin was stained with Hoechst 33342 (blue). Late prophase, metaphase, anaphase and telophase (I. Barasoain y M. Abal).

Coordinación Editorial: Ernesto García
M^a Victoria Lafita
Fco. Javier Medina
Jorge Bernardo Schwartzman

Diseño y maquetación: Jenny C. de I.

TABLA DE CONTENIDOS

— Recuerdos del CIB (Prof. JULIO R. VILLANUEVA)	V
— Comentarios de la Dirección	X
— José Luis Cánovas, <i>in memoriam</i>	XII

RESUMEN DE LA ACTIVIDAD INVESTIGADORA DE LOS GRUPOS

— Dpto. de Biología Celular y del Desarrollo	1
Control Genético del Ciclo Celular	2
Biología Molecular de los Cromosomas Eucarióticos	5
Reproducción Celular	9
Proliferación y Diferenciación de Células Mieloides	12
Regulación de la Expresión de Genes Eucariotas	15
Control Transcripcional en Eucariotas	18
Biología Celular y del Desarrollo de Nematodos	21
Citogenética Molecular de Dípteros	23
Biología del Desarrollo de <i>Drosophila</i>	26
Genética y Dinámica de Zonas Híbridas	29
Biología Molecular de la Gametogénesis	30
Biología de la Reproducción	34
Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados	37
— Dpto. de Biología de Plantas	41
Biología Celular y Molecular Vegetal	42
Entomología. Interacciones Planta-Insecto	48
Organización Nuclear durante el Desarrollo de Plantas	51
Quimiorrecepción en Insectos	55
Virología Molecular de Plantas	57
— Dpto. de Estructura y Función de Proteínas	63
Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores	64
Biología Estructural y Funcional de Factores Endoteliales Vasoactivos	67
Biología Molecular de Bacterias Gram-positivas	72
Bioquímica de <i>Leishmania</i> . Péptidos Eucarióticos con Función Antibiótica	75
Estructura e Interacciones de Tubulina y Taxol	78
Expresión de Antígenos de <i>Leishmania</i>	82
Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-positivas	84
Fotobioquímica Vegetal	87
Interacciones Reversibles de Proteínas en Biología Molecular	90

— Dpto. de Fisiopatología y Genética Molecular Humana	93
Fijación Directa del N ₂	94
Genética Humana	96
Marcadores Tumoraes y Procesos de Envejecimiento	98
Metabolismo y Patología Molecular	101
Microbiología Aplicada	104
— Dpto. de Inmunología	107
Activación de Linfocitos T	108
Adhesión Celular en el Sistema Inmune	110
Biología Celular de las Moléculas de Adhesión	112
Receptores de Membrana	116
Citoquinas y Apoptosis en Células Hematopoyéticas	120
Epítomos Funcionales de Tubulina. Mecanismos Celulares de Acción de Taxoides	123
Diferenciación de Linfocitos Humanos	126
Genética del Complemento/Patología Molecular	129
Virología Molecular de Vaccinia	132
— Dpto. de Microbiología Molecular	135
Biodegradación de la Lignina	136
Bioquímica de Hongos	141
Virología en Acuicultura	144
Carbohidratos Microbianos	147
Genética Bacteriana	149
Genética Molecular de <i>Aspergillus</i>	155
Genética Molecular de <i>Pseudomonas</i>	158
Replicación y Mantenimiento de Plásmidos en Bacterias Gram-negativas	162
Biología Molecular de Hongos Basidiomicetos	166
— Premios y Distinciones	171
— Organización de Congresos y Cursos	173
— Seminarios del Centro	177
— Personal de Servicios	181
— Organigrama CIB	184
— Jubilaciones y Nuevas Incorporaciones de Personal	185
— Resumen de Datos Económicos	187
— Evolución del número de Publicaciones y su Impacto	189
— Índice Alfabético de Investigadores y Teléfonos	191

RECUERDOS DEL CIB

JULIO R. VILLANUEVA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Nos incorporamos al Centro de Investigaciones Biológicas en el último trimestre de 1959, después de una larga estancia en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge. El Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología era nuestro destino y en donde, no sin dificultades, comenzamos nuestra tarea de formar un grupo de investigación interesado en la Bioquímica de Microorganismos, campo en el que habíamos desarrollado nuestro doctorado (Ph.D.) en Cambridge. En el CIB habían iniciado su labor varios grupos importantes relacionados con la Biomedicina encabezados por los Drs. José Luis Rodríguez Candela, Alberto Sols, Eugenio Ortiz y el matrimonio Escobar. En el Instituto Cajal, una serie de investigadores se movían en los ámbitos de los Profs. Julián Sanz y Alfredo Carrato sin olvidar la gran figura del Prof. Fernando de Castro con el que llegamos a tener una excelente relación. Pero, a decir verdad, con el grupo que inmediatamente conectamos fue con el del Dr. Alberto Sols, interesado en la bioquímica de levaduras, tema por el que nosotros manifestamos muy pronto nuestro mayor interés. Por supuesto que establecimos relaciones con los grupos del Instituto "Jaime Ferrán" que por entonces dirigía el Prof. Lorenzo Vilas y, en especial, con los Drs. Miguel Rubio, Román de Vicente Jordana, Genoveva Tejerina, Antonio Portolés, Rafael Lahoz, Ramona Beltrá, Gregorio Fraile, Enrique Feduchi y con tantos otros que por entonces ya desarrollaban su labor en el CIB. Más tarde se crearía el Instituto de Biología Celular constituido por los grupos encabezados por los Drs. Manuel Losada y Gonzalo Giménez Martín, así como por el nuestro. El ambiente científico generado en este Instituto pronto trascendió a otros grupos y contribuyó de forma decisiva, en los años sesenta, al fortalecimiento del CIB.

Es un hecho el que, iniciada ya la década de los sesenta, el Centro comenzó a sufrir una gran transformación. La incorporación de varios jóvenes investigadores después de una

larga estancia en el extranjero supuso una inyección importante al Centro y una gran evolución que rápidamente se puso de manifiesto en su conjunto en el ambiente del Centro. Los seminarios ya existentes se fortalecieron y transformaron, al mismo tiempo que comenzaron a organizarse, de forma sistemática, cursos y conferencias en el pequeño salón de actos que ya existía y que aún perdura en nuestro días. A decir verdad, con el paso de los meses, el ambiente del CIB se fue transformando y mejorando considerablemente y se hacía patente un auténtico deseo de incrementar los niveles científicos estableciéndose una mayor relación entre los grupos, una verdadera colaboración dentro del ambiente general de interdisciplinariedad en diferentes campos biológicos como la Bioquímica, la Endocrinología, la Genética, la Biología Celular, la Microbiología y así todas y cada una de las ramas que por entonces se cultivaban en el Centro.

Por lo que a nosotros respecta, hemos de confesar que, superadas las dificultades iniciales de instalarnos en unos laboratorios y conseguir recursos para adquirir material de laboratorio, nuestros objetivos pronto fueron plasmados en incorporar jóvenes y brillantes investigadores, provenientes de las Facultades de Farmacia (la más fecunda por entonces) y de Ciencias. De esta forma, en el inicio de los años sesenta, se fueron incorporando recién licenciados como Emilio Muñoz Ruiz, José Luis Cánovas (que luego pasó a trabajar con el Dr. Manuel Losada), Conchita García Mendoza, Juan Antonio Leal, María José Rodríguez, Gregorio Nicolás, Federico Uruburu y María Dolores García López, Santiago Gascón y Amparo García Ochoa, Rafael Sentandreu y María Victoria Elorza, Carlos Hardisson Rumeu, Jaime Monreal, Juan Pedro García Ballesta, Antonio Jiménez, etc. Poco después se incorporaba la Dra. Monique Novaes que aportaba una sólida formación de la Universidad de París y que supuso una contribución importante al grupo. A decir verdad, en

poco tiempo, nuestro grupo pronto comenzó a adquirir una cierta personalidad dentro del más puro ambiente de colaboración y de trabajo serio y decidido.

Los temas que inicialmente atrajeron nuestra atención fueron las levaduras y hongos, sobre todo desde el punto de vista de estructura y función. Al mismo tiempo, comenzamos a aislar y caracterizar cepas de actinomicetos, en especial cultivos de *Streptomyces*, que eran estudiados en su doble faceta tanto de productores de enzimas líticas de la pared celular de hongos y levaduras como de productores de antibióticos. A medida que pasaba el tiempo, se fueron elaborando tesis doctorales y publicaciones en revistas internacionales y de nuestro núcleo comenzaron a salir doctores al extranjero, tanto a centros de investigación como a universidades del ámbito europeo o americano. Después de largas estancias en importantes núcleos de investigación, los graduados postdoctorales fueron regresando a España para incorporarse, unos al CIB y otros, después de nuestro traslado a la Universidad de Salamanca, a esta institución.

Si algo deseamos resaltar de nuestra inolvidable época del Centro de Investigaciones Biológicas, es el excelente ambiente de camaradería y colaboración que, poco a poco, se fue generando entre los componentes del grupo de muy diferentes promociones naciendo una amistad que se ha mantenido a lo largo de los años, aún ahora cuando la dispersión producida en los años setenta hizo que muchos de nuestros colaboradores y amigos, gracias a su competencia y formación, fueran obteniendo cátedras en las diferentes Facultades, muchas de ellas nuevas, en la Universidad española.

Quizás es éste el momento de subrayar el espíritu de selección de candidatos para incorporarse a nuestro grupo, aspecto en el que desempeñó un papel fundamental el Dr. Avelino Pérez Geijo, compañero nuestro de curso e íntimo amigo quien, como profesor auxiliar de la cátedra de Geología de la Facultad de Farmacia, nos fue facilitando, con riguroso criterio científico, licenciados brillantes de las nuevas promociones de Farmacia que, sin tardar mucho, se transformarían en auténticos investigadores y docentes y que, pasado el tiempo, comandan y dirigen formidables equipos de investigación en

otros centros y universidades. Pero, además, debemos de destacar el papel de Avelino Pérez Geijo cuando se incorporó como administrador del CIB, siendo director el Prof. Jesús García Orcóyen. En relativamente poco tiempo, organizó y transformó el Centro poniendo orden en muchos aspectos y constituyendo equipos de personal auxiliar y técnico que contribuyeron a hacer que las cosas fueran más fáciles y que las labores de los grupos de investigación se hicieran más consistentes y participativas. Estoy seguro de que muchos, aún ahora, recuerdan con gratitud la ayuda prestada por el Dr. Pérez Geijo para llevar adelante, con la mayor generosidad, las labores creativas y docentes que se desarrollaban en el Centro.

Antes de concluir este prólogo quisiera, de forma abreviada, expresar mis recuerdos a una de las épocas más felices y fecundas de mi vida, lo que en realidad representó el Centro de Investigaciones Biológicas en los años sesenta como lugar del nacimiento de la Bioquímica española así como la Microbiología, Genética, Biología Celular, Endocrinología y de tantas ramas que podrían ahora mencionarse. El ambiente humano y científico generado en el Centro pronto comenzó a suponer un reto al desarrollo de varias de esas ramas biológicas en España. Es un hecho histórico que, en el CIB, nació y se generó la idea de la creación de la Sociedad Española de Bioquímica gracias al impulso adquirido en el Centro por esta rama de la Biología. La labor de promoción, incluso como símbolo, del Dr. Alberto Sols junto con la de Manuel Losada, Carlos Asensio, Gertrudis de la Fuente, y nosotros mismos estimuló el desarrollo formidable de la Bioquímica en España y, en pocos años, hizo que esta especialidad se hiciera y fuera considerada modelo del desarrollo científico español. En todos estos pasos no nos faltó en ningún momento el apoyo del Prof. José María Albareda quien, hasta su muerte repentina en 1966, representó siempre un estímulo y una ayuda a nuestras inquietudes y ansias de mejorar el nivel de la ciencia en España. Y en este sector, la labor del CSIC hay que reconocer que fue decisiva, como ha sido reconocido en ámbitos muy diferentes del desarrollo científico español.

No hay la menor duda de que las semillas sembradas en el Centro en los años sesenta y setenta se desarrollaron y fructi-

ficaron muy pronto dando lugar a la actual expansión, especialmente de la Bioquímica y de la Microbiología en nuestro país. Y de allí salieron excelentes investigadores que fueron fundamentales para la creación de centros de excelencia personalizados por el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", la gran mayoría de cuyas cabezas directivas se formaron en el ámbito del CIB, así como por el Instituto de Investigaciones Biomédicas, el Centro Nacional de Biotecnología, el Instituto de Microbiología Bioquímica de Salamanca, el Instituto de Biología Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla y tantos otros grupos cuyas cabezas visibles se formaron en el Centro y que luego se dispersaron en diferentes cáte-

dras y departamentos universitarios repartidos por toda la geografía española. Y es el momento de reconocer que el desarrollo científico en España ha alcanzado su mayoría de edad al poder contar con personas y equipos de elevada calidad científica traducida en sus publicaciones y actuaciones científicas en los más diferentes y variados foros internacionales. Todo esto nos anima a decir que el CIB debe seguir ascendiendo peldaños en el desarrollo científico internacional reconociendo la realidad actual de los excelentes grupos de investigadores que hoy desarrollan sus actividades en uno de los centros símbolo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en la calle de Velázquez en Madrid.

MEMORIES OF THE CIB

JULIO R. VILLANUEVA

DEPARTMENT DE MICROBIOLOGY
FACULTY OF BIOLOGICAL SCIENCES
UNIVERSITY OF SALAMANCA

I started working at the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) during the last quarter of 1959, after a long period at the Department of Biochemistry at Cambridge University. I was appointed at the Institute of Microbiology "Jaime Ferrán" and, not without difficulties, we initiated our task of building up a research team focused on Microbial Biochemistry, the research field in which I had worked during my Ph.D. in Cambridge. In the CIB there already were some important groups related to Biomedicine led by Drs. José Luis Rodríguez Candela, Alberto Sols, Eugenio Ortiz and Mr. and Ms. Escobar. There also was a number of researchers working under the leadership of Profs. Julián Sanz and Alfredo Carrato at the Cajal Institute. One cannot fail to mention the important figure of Prof. Fernando de Castro, with whom we had an excellent relationship. But, to be honest, the group with which we had a better relationship from the beginning was the one led by Dr. Alberto Sols. It was focused on yeast biochemistry, a topic for which we soon developed a strong interest. In the CIB we also established contacts with existing groups at the Institute "Jaime Ferrán", which was at that time directed by Prof. Lorenzo Vilas. We were particularly close to Drs. Miguel Rubio, Román de Vicente Jordana, Genoveva Tejerina, Antonio Portolés, Rafael Lahoz, Ramona Beltrán, Gregorio Fraile, Enrique Feduchi and many other who were already working at the CIB. The Institute for Cell Biology was introduced at a later stage. Its foundation was based on the groups headed by Drs. Manuel Losada, Gonzalo Giménez and myself. The scientific atmosphere generated by this young Institute soon spread across the other teams and contributed decisively to the strengthening of the CIB.

It is a fact that, during the sixties, the Centre went under an important process of development. The incorporation of young researchers who had profited from long periods of research activities in the most prestigious laboratories in Europe and the USA contributed greatly with their efforts to initiate a positive evolution in the mentality of the scientific staff. The existing depart-

ments grew stronger in scientific prestige and, at the same time, seminars and lectures were organised periodically in the small conference-room that still exists. To tell the truth, as months passed by, the atmosphere at the CIB kept changing and improving. There was an authentic desire to improve the scientific level with more connections among the different groups: sincere and productive joint activities took place under a general environment of interdisciplinary work in different biological fields such as Biochemistry, Endocrinology, Genetics, Cell Biology and all areas which were then researched at the Centre.

As for us, one must acknowledge that, once the initial difficulties (establishing new laboratories, acquiring scientific equipment and chemical products) were overcome, our goals were gradually achieved. Brilliant graduate students from the Pharmacy Faculty (the most fruitful one in that time) and the Science Faculty joined us. So, at the beginning of the sixties, recent graduates such as Emilio Muñoz Ruiz, José Luis Cánovas (who would work with Dr. Manuel Losada at a later stage), Conchita García Mendoza, Juan Antonio Leal, María José Rodríguez, Gregorio Nicolás, Federico Uruburu and María Dolores García López, Santiago Gascón and Amparo García Ochoa, Rafael Sentandreu and María Victoria Elorza, Carlos Hardisson Rumeu, Jaime Monreal, Juan Pedro García Ballesta, Antonio Jiménez, etc. started working with our group. Shortly afterwards, Dr. Monique Novaes joined the team with her solid scientific background from Paris University. Her relevant contribution was greatly appreciated. In a very short time our team developed a personality of collaborative, rigorous and fruitful work.

Initially, we felt most attracted towards the fields of yeasts and fungi, especially in relation to their structure and function. At the same time, we started to isolate and characterise strains of actinomycetes and particularly types of *Streptomyces*, which were studied as producers of either lytic enzymes or antibiotics.

As time passed by, more doctoral theses were written and more articles were published in international journals. Doctors from our team went abroad, both to Research Institutions and Universities in Europe and America. After long periods abroad, those postdoctoral graduates returned to Spain to rejoin the CIB or to Salamanca University, where our Institute was moved.

If something should be stressed from that unforgettable period at the Centro de Investigaciones Biológicas, it should be the remarkable atmosphere of friendship and collaboration which was developed among team members of very different ages. A strong sense of friendship was developed which has been maintained during the years, even though during the seventies most of our colleagues and friends were scattered when, due to their competence and qualifications, they were granted chair positions (many of which were of new creation) in different Spanish University Faculties.

This may be the moment to remember the spirit which drove the selection of candidates for our team. A major role was played in this field by Dr. Avelino Pérez-Geijo, a very close friend of mine who had graduated with us. As Professor at the Geology Department at the Faculty of Pharmacy he introduced to us some of the most brilliant graduates from the new generations using strict scientific criteria. Most of them became excellent researchers and professors and now lead important research teams in other research Institutions and Universities.

But one must point out the outstanding role played by Avelino Pérez-Geijo as General Manager at the CIB working with Prof. Jesús García Orcroyen as Director. In a relatively short time he organised and transformed the CIB by introducing and organising the auxiliary and technical staff who contributed to make the research teams' tasks more consistent and participative. I am confident that there are many now who still remember with appreciation Dr. Pérez-Geijo's most generous contribution to the accomplishment of the creative and teaching activities that took place in the Centre.

Before finishing this Preface and in a few words I would like to express my happiest regards to one of the most productive periods of my life: my stay at the CIB, which was in the sixties the birthplace of Biochemistry, Microbiology, Genetics, Cell

Biology and Endocrinology in Spain. The scientific and personal atmosphere generated in the Centre would soon be a challenge for the development of these biological areas in the rest of Spain. It is a historical fact that the idea of establishing the Spanish Society of Biochemistry was born and developed in the CIB due to the fact that this discipline had a tremendous growth in prestige at this Centre. The prestigious scientific work carried out by Dr. Alberto Sols, Manuel Losada, Carlos Asensio, Gertrudis de la Fuente and ourselves facilitated the tremendous development of Biochemistry in Spain causing that, in a few years, this area was seen as a model for science development in Spain. During all this period we always had the support of Prof. José María Albareda who, until his sudden death in 1966, was always a figure of stimulus and assistance for our wish to increase the scientific level in Spain. In the field of Biochemistry, one must not fail to acknowledge the supportive effort done by the CSIC.

There's no doubt that the seeds sown at the CIB during the sixties and seventies grew and gave fruit very soon allowing for the current development of Biochemistry and Microbiology in our country. From the CIB arose key researches who participated in the creation of high quality Institutions. The Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", where most of its leading teams had been trained at the CIB. Other instances are the Instituto de Investigaciones Biomédicas, the Centro Nacional de Biotecnología, the Instituto de Microbiología de Salamanca, the Instituto de Biología Vegetal y Fotosíntesis in Seville and so many other groups whose leaders had been trained at the CIB to be scattered later in different university chairs and departments all over Spain. It is the time now to acknowledge that scientific development in Spain has come of age as it can now count on high-quality researchers and teams of an outstanding scientific level who have demonstrated their achievements in all types of scientific publications and events all over the world. All this encourages me to say that the CIB will indeed achieve even higher goals in the international scientific development due to the outstanding research teams that currently work in Madrid at one of the most emblematic institutions of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas, the Centro de Investigaciones Biológicas.

COMENTARIOS DE LA DIRECCIÓN

GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO
Director

A lo largo de estas páginas pretendemos dar a conocer a la comunidad científica lo que ha sido nuestro trabajo en estos dos últimos años y rendir cuentas a la sociedad de cómo hemos utilizado los recursos que ha puesto a nuestra disposición.

Estos dos últimos años han sido difíciles debido a la necesidad de corregir los desequilibrios que se han producido en la Administración como consecuencia de la modernización del Estado, y a los ajustes que está siendo preciso llevar a cabo con vistas a la implantación de la moneda única europea. Debido a estas circunstancias y aunque las subvenciones que hemos recibido para mantener activos nuestros proyectos de investigación han seguido la tónica de años anteriores, las partidas destinadas a becas y contratos se han visto recortadas drásticamente. Estas dificultades han aflorado, además, en un momento en que los países occidentales han comenzado a encontrar serias dificultades para mantener las instituciones orientadas a la investigación científica básica. Por un lado, el dinero invertido en este tipo de investigación, una cantidad nada despreciable del presupuesto nacional, no se traduce en beneficios que renten primordialmente en favor de los países inversores. Por si fuera poco, ha comenzado a ser perentoria una puesta al día de la infraestructura laboral de estas instituciones, proceso que reclama inversiones adicionales importantes.

A lo largo de estos últimos años, la evolución de las instituciones científicas de corte académico ha acabado llevándonos a un punto en que la situación laboral de sus jóvenes investigadores es considerablemente peor que la que disfrutaban el resto de los ciudadanos que poseen una cualificación profesional equivalente. El desarrollo, casi exponencial en algunos momentos, de la infraestructura científica en los países de occidente ha compensado en las últimas décadas los efectos de la precariedad laboral que tradicionalmente ofrecían estas instituciones científicas a los jóvenes investigadores. Sin embargo, desde hace unos años, este modelo ha comenzado a

presentar, en todo el mundo desarrollado, los síntomas de crisis inherente a estos tipos de crecimiento, poniendo con ello en evidencia la baja calidad de empleo que ofrecía el sistema a los jóvenes investigadores en las instituciones académicas. Para tipificar la situación es suficiente con fijar nuestra atención en la situación laboral de nuestros "investigadores contratados" y en el futuro que ponemos delante de los ojos de nuestros becarios predoctorales con vocación investigadora, dos grupos que constituyen una parte muy importante de los recursos humanos de la mayor parte de los laboratorios del mundo académico occidental. Sin la posibilidad de ofrecer un futuro digno a los jóvenes investigadores, nuestra ciencia está seriamente herida.

Es difícil concebir que nuestra sociedad pueda subsistir sin que se mantengan los niveles actuales de investigación de corte académico. Sin embargo, mantenerlos, va a requerir el empeño y la colaboración estrecha de los investigadores, la sociedad y sus dirigentes en la búsqueda de nuevas fórmulas. En el año 1996 se cumplieron cuarenta años desde que el Centro de Investigaciones Biológicas comenzó a funcionar y a poner los cimientos de una parte considerable de la Biomedicina española. Los herederos de este empeño nos hemos esforzado en que las circunstancias adversas de estos últimos años no den al traste con los resultados de tantos años de esfuerzo. De ello da testimonio esta Memoria. No obstante, sin una colaboración seria de nuestro entorno social, nuestros esfuerzos habrán sido inútiles dentro de unos pocos años.

COMMENTS OF THE DIRECTION

GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO
Director

Our purpose in this Biennial Book is to inform the scientific community about our activities in the last two years and to explain the use we have made of public resources.

These two years have been difficult ones due to the need to correct the existing unbalances in the State Administration caused by its modernisation and also because of the adjustments required in order to achieve the goal of a single European currency. Due to these factors, and even though the amounts granted to maintain our research projects have been maintained at the level of previous years, there have been substantial decreases in the budget for student grants and postdoctoral and other personnel contracts. Furthermore, these difficulties have arisen in an international background in which Western countries have started to have problems to maintain institutions oriented to basic research. On the one hand, the money invested in this type of research, an important amount in the National budgets, does not revert mainly to the countries which make the spending and, on the other, the need to update the staff structure of these institution has become more and more evident, requiring further investment.

During the last years, the evolution of academic scientific institutions has reached a point in which the working conditions for young researchers are much worse than those enjoyed by citizens with similar qualifications. The nearly exponential growth of the scientific infrastructure in Western countries has compensated, during the last decades, the effects of employment insecurity that these scientific institutions meant for young researchers. Nevertheless, in the developed countries during the last years this model has entered a crisis inherent to this type of growth, making it apparent that the system offered poor working conditions for young researchers in the academic institutions. As an instance, suffice it to mention the situation of our researchers under temporary contract and the future that we can offer to our pre-doctoral students with a vocation for research. These two groups form the majority of the task force in most laboratories in western countries. If we are not able to offer a sound future to young researchers, our science will be seriously injured.

It is hard to think that our society may survive if the current levels of academic research are not maintained. To achieve this, however, the effort and close collaboration of researchers, the public and their leadership in search of new ways is essential. 1996 was the 40th anniversary of the establishment of the Centro de Investigaciones Biológicas, which marked the beginning of an important part of Spanish Biomedicine. As heirs to this effort, we have made our best not to allow that the adverse conditions of the last period destroy the achievements of years of work. This Biennial Book is a witness of this effort. It must be pointed out, however, that, without the collaboration of our social environment, all our work will have been futile in a few years' time.

José Luis Cánovas, *in memoriam*

Con la prematura muerte del Prof. José Luis Cánovas, en septiembre de 1995, hemos perdido a una de las personas que han vivido y participado más intensamente en la vida de este Centro desde su regreso de la Universidad de California, en Berkeley, donde había sido contratado como colaborador científico por el Prof. R. Y. Stanier. El Prof. Cánovas, a su regreso a finales de 1967, supo seleccionar y atraer a un número de becarios al área de la regulación del ciclo celular, primero en procariotas y más tarde en eucariotas, que a su vez se transformaron en excelentes investigadores. Para el Centro resultó uno de sus miembros más activos. Primero, por las ayudas internacionales que supo conseguir, como las obtenidas del National Institute of Health (USA) al principio de los 70 con los Drs. David Vázquez y Emilio Muñoz. Pero, por encima de todo, porque participó de forma entusiasta en la tarea de mantener una espléndida vida científica en este Centro, con la organización de reuniones, el mantenimiento de relaciones vivas y frescas con los mejores colegas internacionales, su participación entusiasta en los seminarios, etc. También asumió tareas directivas en este Centro a lo largo de unos años.

A finales de los 70 fue nombrado Vicepresidente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Sus magníficas cualidades científicas y humanas le hicieron participe de numerosas tareas en el ámbito europeo que siempre le dejaron una estela de buenos amigos. Así, fue miembro del Comité Ejecutivo de la *European Science Foundation*, desde la que propició el nacimiento de la *Academia Europaea* de la que fue socio fundador, bajo patrocinio de la *Royal Society*. Representó muchas veces a nuestra institución en el ámbito científico internacional, interviniendo en Programas de la *UNESCO* y de la *OEA* para el ámbito iberoamericano.

Desde 1986 hasta su muerte fue jefe del grupo de Reproducción Celular de este Centro. Fue siempre generoso con su tiempo. Así, participó en la realización de las últimas Memorias de este Centro. Pero sobre todo, además de ser un excelente científico, fue un hombre cabal, un amigo sincero al que todos recordamos por su elegancia espiritual, al que muchos encontrábamos siempre abierto a la conversación y al consejo y del que muchos nos consideramos hoy huérfanos. Descanse en paz.

C. de la Torre.

José Luis Cánovas, in memoriam

This Center has missed with Prof. José Luis Cánovas' death, in September 1995, one of the colleagues who most actively participated in the scientific life of the CIB. He came back to Spain by the end of 1967 from the University of California, at Berkeley, after a two years long stay with Prof. R.Y. Stanier, as assistant research bacteriologist. Then, he managed to attract and select in Madrid a group of young fellows to the area of cycle regulation, first in prokaryotes and later on in eukaryotes, people that now form a group of excellent researchers. It was one of the most active members of the Center. First, because of the international support he got in the early 70s, as that obtained from the National Institute of Health together with Dr. David Vázquez and Dr. Emilio Muñoz. Moreover, he was enthusiastically involved in keeping very high the scientific life among us, in organizing international meetings, in keeping excellent and lively contacts with the best scientific teams, in participating in the seminars of the Center, etc. In addition, he was involved in directing tasks in this Center for some years.

By the end of the seventies, he was appointed Vice-president of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. His superb scientific and human qualities allowed him to successfully deal with many tasks at the European and international levels. He was a member of the Executive Committee of the European Science Foundation, from where he supported the birth of the Academia Europaea, under the patronage of the Royal Society. He very often represented our Institution in the international scientific area. He participated in UNESCO and ASO Programs for Iberoamerica, etc.

From 1986 up to his death he was the leader of the Cell Reproduction group in this Center. He was always generous with his time. Thus, he participated in the edition of the recent scientific reports of this Center as well as in many other tasks. But over all his activities, even over the fact that he was an excellent scientist, he was a good man, a sincere friend whose intellectual elegance is always remembered among us. He inspired affection and admiration. He was always open to talk and to give an advice, if asked for. Many of us consider ourselves his orphans. He is very much missed.

C. de la Torre.



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

Jefe de Departamento
Department Head

FLORA DE PABLO DÁVILA
JAVIER REY CAMPOS
(Desde XI-1995 hasta I-1997)
JORGE BERNARDO SCHVARTZMAN BLINDER
(Hasta XI-1995)

Profesores de Investigación

JOSÉ LUIS CÁNOVAS PALACIO-VALDÉS († IX-1995)
CONSUELO DE LA TORRE GARCÍA-QUINTANA

Investigadores Científicos

JOSÉ LUIS DíEZ CORTES
PEDRO ESPONDA FERNÁNDEZ
FLORA DE PABLO DÁVILA
LUCAS SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
EDUARDO TORROJA CAVANILLAS
MIGUEL VICENTE MUÑOZ

Colaboradores Científicos

PATRICIO ALLER TRESGUERRES
LUISA M^a BOTELLA CUBELLS
ENRIQUE J. DE LA ROSA CANO
CLARA GODAY BAYLINA
PABLO HERNÁNDEZ VALENZUELA
DORA BEATRIZ KRIMER SMUNIS
JESÚS DEL MAZO MARTÍNEZ
JAVIER REY CAMPOS
JORGE BERNARDO SCHVARTZMAN BLINDER
MIGUEL ÁNGEL VIDAL CABALLERO

Secretaría

M^a DEL CARMEN PARTEARROYO LACABA

Control Genético del Ciclo Celular

Genetic Control of the Cell Cycle

MIGUEL VICENTE

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

KLAS FLÄRDH (Hasta VII-1996)

TERESA GARRIDO (Hasta III-1996)
B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

MANUEL BALLESTEROS

M^a JOSÉ FERRÁNDIZ

LARA FERRERO (1996)

ANA MARTÍNEZ (A tiempo parcial)

LUCÍA YIM

B. Predoctorales/*Graduate Students*

PILAR PALACIOS

Personal Técnico/*Technical Staff*

La división celular como fuente de blancos para inhibir la proliferación bacteriana

Palabras clave: *Escherichia coli*, división celular, regulación, agrupamiento *dcw*, septador.

En los últimos años el estudio de la división celular en *Escherichia coli* ha producido éxitos notables en la identificación de un número de genes (genes *fts*) que son responsables del proceso de segmentación, y también en la demostración de que tales genes son esenciales. La septación en *E. coli* implica la acción concertada de varias moléculas en una estructura que llamamos septador, y que podemos definir como formada por proteínas, precursores y cadenas de peptidoglicano. Las proteínas que forman parte del septador son pues candidatos potenciales idóneos para encontrar inhibidores de la proliferación bacteriana porque son esenciales para la división celular y porque algunas de ellas se conservan a lo largo de la escala filogenética (Vicente and Errington, 1996). En especial se ha visto que *FtsZ*, una de las proteínas que inicia la formación del septo, está conservada en muchas bacterias, incluidos los patógenos intracelulares como *Mycoplasma*, los organismos que esporulan como *Bacillus subtilis*.

Cell division as a source of targets to inhibit bacterial proliferation

Keywords: *Escherichia coli*, cell division, regulation, *dcw* cluster, septator.

Recent studies on *Escherichia coli* cell division have succeeded both in the identification of a number of genes (*fts* genes) which are involved in septation, and in demonstrating that several of them are essential. *E. coli* septation involves the concerted action of a number of molecules in a structure called septator which, for our purposes, can be defined as being formed by proteins, peptidoglycan precursors and peptidoglycan chains. Septator proteins appear as likely candidates to find inhibitors of bacterial proliferation because they are essential for cell division, and because some of them are phylogenetically conserved (Vicente and Errington, 1996). *FtsZ* in particular, one of the proteins that initiates septum formation, is conserved in a wide range of bacteria, including intracellular pathogens such as *Mycoplasma*, sporulating organisms as *Bacillus subtilis*, and in bacteria which have different stages in their life cycles as *Rhizobium meliloti* and *Streptomyces coelicolor*.

lis, y en bacterias como *Rhizobium meliloti* y *Streptomyces coelicolor* que poseen distintos estadios en su ciclo biológico.

Regulación de la expresión de genes esenciales de *Escherichia coli*

Un buen número de las proteínas del septador (entre ellas PBP3, FtsQ, A y Z) están codificadas por genes que pertenecen a un agrupamiento génico denominado *dcw* (*division and cell wall*). En éste agrupamiento se localizan más de una docena de genes que codifican proteínas que o bien son componentes del septador, o son enzimas que intervienen en la síntesis de los componentes del peptidoglicano. El agrupamiento *dcw* está conservado en un amplio rango de eubacterias, incluyendo microorganismos de interés clínico e industrial, algunos elementos se encuentran incluso en archaea y micoplasmas. Datos preliminares de nuestro grupo indican que la cantidad de proteína FtsZ por célula es casi constante e independiente de la velocidad de crecimiento en muchas bacterias. La regulación de la expresión génica del agrupamiento muestra una gran complejidad de mecanismos reguladores (Palacios *et al.*, 1996), así como una diversidad filogenética que refleja las peculiares adaptaciones de cada género bacteriano a su hábitat y a su ciclo biológico específico. Sin embargo se han conservado ciertas propiedades fundamentales, como la regulación de algunos promotores específicos por un factor sigma alternativo ($\sigma^S \equiv RpoS$) relacionado con la entrada en fase estacionaria.

Regulation of expression of essential *Escherichia coli* genes

A number of septator proteins, among them PBP3, FtsQ, A, and Z, are coded by genes which belong to a gene cluster called *dcw* (*division and cell wall*). The *dcw* cluster contains over a dozen genes that code for proteins involved in the synthesis of the bacterial wall or the division septum. The cluster is conserved in a wide range of eubacteria, including microorganisms of industrial and clinical relevance, some of its elements are even found in archaea and mycoplasmas. Preliminary data from our group indicate that the amount of FtsZ protein per cell is almost constant in many bacteria, and independent of the growth rate of the culture. Regulation of gene expression in the *dcw* cluster involves a complex set of regulatory pathways (Palacios *et al.*, 1996), which nevertheless show a phylogenetical diversity as a consequence of the peculiarities in the adaptation of different genera to their specific habitat and life cycle. Some basic elements of the regulatory mechanisms are nevertheless conserved, this is the case of the regulation of some specific promoters by an alternative sigma factor ($\sigma^S \equiv RpoS$) which is related to the entrance into stationary growth phase.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- CE, Biotechnology. Ref. PL920483. Coordinador. (1993-1995).
- CE, *Human Capital and Mobility*. Ref. ERBCHRXCT920010. (1993-1995).
- DGICYT, PB93-1232. (VII-1994/VII-1997).
- CE, BIOTECH. Ref. BIO4-CT96-0122. Coordinador. (01-XI-1996/31-X-1999).
- CICYT, Ref. 95-0057-OP. (01-X-1996/01-X-1998).

Publicaciones/*Publications*

- Palacios, P., Vicente, M., and Sánchez, M. (1996). Dependency of *Escherichia coli* cell-division size, and independency of nucleoid segregation on the mode and level of *ftsZ* expression. *Mol. Microbiol.* **20**, 1093-1098.
- Vicente, M., and Errington, J. (1996). Structure, function and controls in microbial division. *Mol. Microbiol.* **20**, 1-7.
- Vicente, M., Flårdh, K., Sánchez, M., and Garrido, T. (1996). La expresión de los genes de la división celular de *Escherichia coli* y el papel de sus productos en la formación del septo. En *Microbiología y Genética Molecular*, J. Casadesús, ed. (Huelva: Serv. Publ. Univ. de Huelva), pp. 613-633.

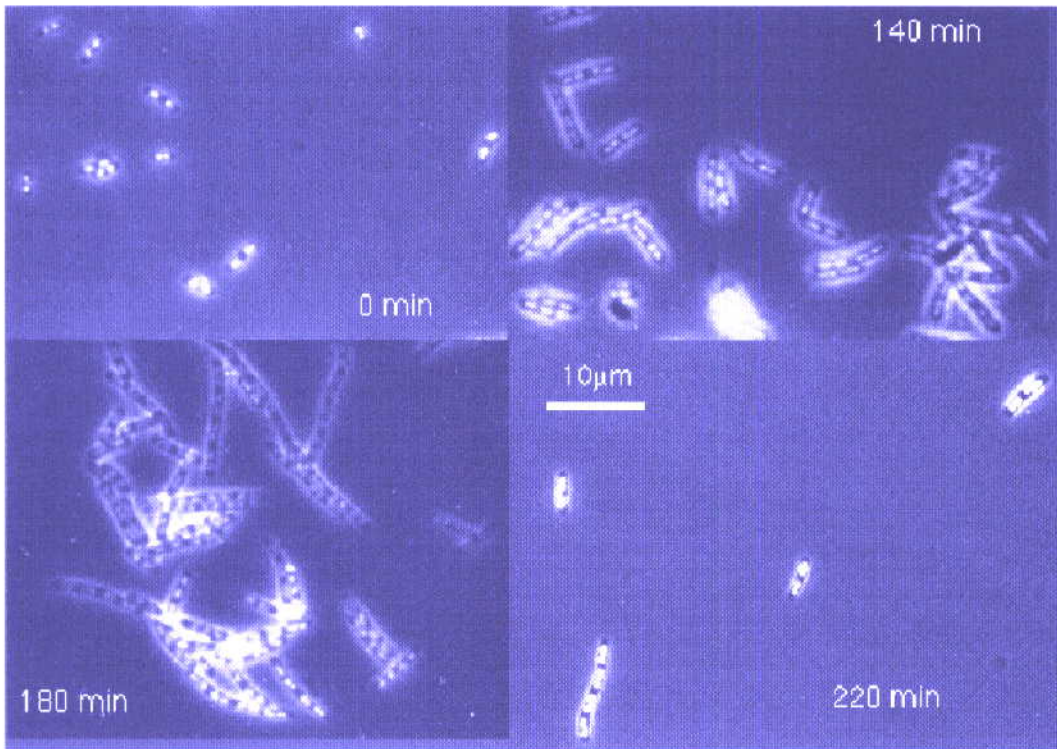


Figura: Morfología de células de la estirpe VIP205, en la que la expresión de *ftsZ* se ha disociado de las señales reguladoras naturales, cuando se induce la expresión a partir del promotor *tac* de manera que la concentración celular de FtsZ baja desde el 140% del contenido de la estirpe salvaje (arriba a la izquierda) hasta el 80% (abajo a la derecha). El crecimiento no se ve alterado, pero tras un período en el que la división celular se frena (arriba a la derecha) y las células filamentosas, la división vuelve a recuperarse (abajo a la izquierda) pero las células no son capaces de recuperar su morfología normal, dividiéndose con un tiempo de duplicación normal, pero con una longitud mayor (abajo a la derecha). En ningún momento se altera la cantidad ni la distribución de los nucleoides.

Figure: Morphology of VIP205 cells in which expression of *ftsZ* is dissociated from the natural regulatory signals, after induction from the *tac* promoter. During the experiment the concentration of FtsZ decreases from 140% the wild type levels (top left) to 80% (bottom right). Although growth is not altered, cell division is delayed (top right) causing filamentation. Recovery of division occurs (bottom left) but the cells are unable to recover the normal morphology and although they divide after normal duplication times they are longer (bottom right). Nucleoid concentration and segregation do not become altered.

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 (Hasta XI-1995)
CARLOS LÓPEZ ESTRAÑO (Hasta V-1996)
LETICIA OLAVARRIETA SCAPPINI (Desde X-1996)
ALICIA SÁNCHEZ GOROSTIAGA (Desde XI-1995)
DAVID SANTAMARÍA VELILLA
NATASHA VANEGAS GÓMEZ (Desde X-1995)
ENRIQUE VIGUERA MÍNGUEZ (Hasta VII-1996)
B. Predoctorales/Graduate Students

M^ª LUISA MARTÍNEZ ROBLES
M^ª PILAR ROBLES GONZÁLEZ
Personal Técnico/Technical Staff

Iniciación y terminación de la replicación

Palabras clave: Orígenes y términos de replicación, barreras de replicación, electroforesis bidimensional en geles de agarosa, estereoisómeros, cromosomas artificiales, virus del papiloma bovino (BPV), virus de Epstein-Barr (EBV).

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

Initiation and termination of DNA replication

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

Analysis of DNA replication intermediates (RIs) by two-dimensional agarose gel electrophoresis allows the 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. We developed a

estudio. A lo largo de estos dos últimos años, hemos desarrollado un modelo computacional que nos permite predecir el patrón esperado en un gel bidimensional para cualquier fragmento de restricción cuya replicación se quiera estudiar. También hemos comprobado que los orígenes de replicación unidireccional del tipo ColE1 actúan como barreras polares para el progreso de otras horquillas de replicación que se mueven en dirección opuesta. Estas barreras o sitios de pausa dan lugar a la acumulación de intermediarios de replicación que contienen una burbuja interna, lo que facilita la formación de nudos. Estos estudios nos han llevado a describir y caracterizar una nueva familia de estereoisómeros que contienen una burbuja interna con distinto número de nudos en el interior de la burbuja.

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

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

En células eucarióticas, los efectos deletéreos de la colisión entre transcripción y replicación son evitados por la presencia de barreras polares para la replicación que impiden que los complejos replicativos que se mueven en el sentido contrario a la transcripción entren en una unidad transcripcional. Este es el caso de los genes que codifican para el RNA ribosómico (rDNA), en los que hay una coincidencia temporal entre replicación y transcripción. Nuestros resultados indican que este bloqueo polar está mediado por proteínas específicas de unión a secuencias localizadas en la zona de la barrera que impiden el desplazamiento del replisoma por inhibición de alguno de sus componentes, probablemente la actividad DNA helicasa. Las horquillas de replicación se detienen en una serie de repeticiones cortas que constituyen los sitios de unión de factores para la terminación de la transcripción por RNA polimerasa I, indicando que la terminación de la transcripción del rRNA y las barreras para la replicación que impiden la colisión de ambos procesos están íntimamente relacionados. Recientemente hemos iniciado un nuevo proyecto que pretende establecer de qué modo la replicación de microsatélites de trinucleótidos da lugar a las expansiones o mutaciones dinámicas responsables de una serie de enfermedades hereditarias

computer model that allows us to predict the expected 2D gel pattern for any DNA fragment. We demonstrated that unidirectional replication origins of the ColE1 type, act as replication fork pausing sites for other forks moving in the opposite direction. These polar pausing sites lead to the accumulation of replication intermediates containing an internal bubble, which in turn promotes the formation of knots within the accumulated bubble. All these observations led us to the characterization of a novel family of stereoisomers containing an internal bubble with different number of knots within the bubble itself.

DNA replication arrest in eukaryotes and its relationship with dynamic mutations

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

In eukaryotic cells, the deleterious effects of collision between transcription and replication are avoided by the presence of polar replication barriers. These barriers prevent replication complexes moving in the direction opposite to transcription to enter into transcriptional units. This is the case for genes coding for the ribosomal RNA (rDNA), where there is a temporal coincidence between transcription and replication. Our results indicate that this polar blockage is mediated by binding proteins that specifically recognize DNA sequences located in the barrier, arresting the replisome probably by inhibiting DNA helicase activity. Replication forks are arrested at short DNA repeated sequences that are the target for binding protein factors involved in transcription termination by RNA polymerase I. Thus, termination of rRNA transcription and replication fork barriers in the rDNA seem to be related. Recently, we have initiated a new project to establish how DNA replication of trinucleotide tandem repeats leads to copy number expansions, also known as dynamic mutations. These mutations are responsible for a series of human hereditary diseases. Several replication features of the affected loci are studied in detail, both in their chromosomal context and introduced into autonomously replicating plasmids. This study includes location of replication origins and replication fork barriers, construction of replication direction maps and their correlation with microsatellite instability.

humanas importantes. Para ello estamos estudiando las características de la replicación de los loci afectados, tanto en su contexto genómico como introducidos en plásmidos de replicación autónoma, incluyendo la localización de orígenes y barreras de replicación, construcción de mapas de dirección de replicación y su correlación con la estabilidad de los microsatélites.

Identificación y clonaje de genes involucrados en la diferenciación celular

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

Esta línea de investigación se centra en la identificación y aislamiento de genes involucrados en la diferenciación eritropoética. Como modelo de trabajo utilizamos la línea celular MEL (*murine erythroleukemia*) o células Friend derivadas de progenitores eritroides cuya diferenciación ha sido bloqueada. Estas células pueden ser inducidas a reiniciar el proceso por medio de compuestos químicos entre los que destaca el hexametilénbisaacetamida (HMBA). Nuestro objetivo principal es la identificación de genes cuya activación (o inactivación) tiene 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 mRNAs aislados de células MEL tratadas con HMBA. Se han identificado varios genes que presentan una expresión diferencial entre los que destacamos una proteína quinasa, las histonas H3.3A y H3.3B y la proteína ribosómica S5. Asimismo, se han aislado genes cuyas secuencias no presentan homología con las existentes en las bases de datos del GenBank/EMBL y que están siendo analizados con el objeto de comprobar su especificidad en tejidos eritroides y su posible papel en la diferenciación celular.

Identification and cloning of genes involved in erythroid differentiation

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

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 hexamethylénbisaacetamide (HMBA). Our main goal is to identify genes that are activated or repressed during the early steps of differentiation. We have used subtraction hybridization with complex cDNA probes synthesized with mRNAs isolated from undifferentiated and cells committed to differentiate to screen a cDNA library made with polyA+ mRNA from cells that were induced to differentiate with HMBA. We identified several genes showing a differential pattern of expression during differentiation. Among them those coding for a protein kinase, the H3.3A and H3.3B histones and the ribosomal protein S5. We also cloned several genes showing no homology with those registered at GenBank/EMBL. We are currently testing whether some of these genes are erythroid specific and their possible role in cell differentiation.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- FIS, 93/0161. (1993-1995).
- CAM, AE00118/94. (1994-1995).
- DGICYT, HF94-01. (1994-1995).
- Convenio CSIC-Universidad de Tel-Aviv. (1994-1995).
- FIS, 96/0470. (1996-1998).
- CICYT, PM95-0016. (1996-1999).

Publicaciones/Publications

- López-Estraño, C., Schwartzman, J.B., and Hernández, P. (1996). The replication of ribosomal RNA genes in eukaryotes. In *Chromosomes Today*. N. Henriques-Gil, J.S. Parker and M.J. Puertas, eds. (London, Chapman & Hall), vol. 12, pp. 149-169.
- Viguera, E., Hernández, P., Krimer, D.B., Boitsov, A.S., Lurz, R., Alonso, J.C., and Schwartzman, J.B. (1996). The ColE1 unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site. *J. Biol. Chem.* 271, 22414-22422.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- López-Alañón, DM., López-Fernández, L.A., Castañeda, V., Krimer D.B., and Del Mazo, J. H3.3A variant histone mRNA containing an α -globin insertion: modulated expression during mouse gametogenesis correlates with meiotic onset. *DNA Cell Biol.* (en prensa, 1997).

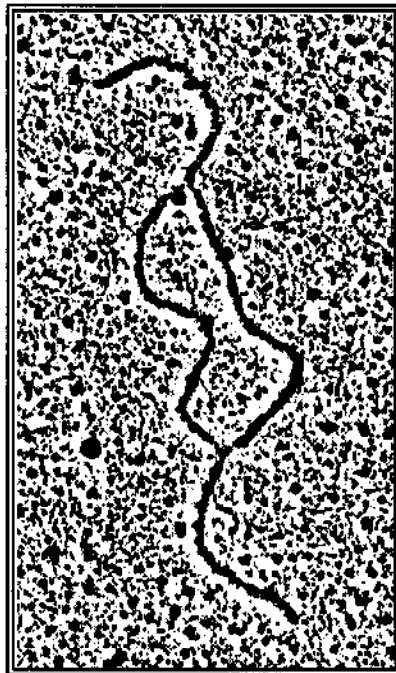


Figura: Microscopía electrónica de un fragmento de DNA correspondiente al plásmido pPI21 de *Escherichia coli*, que presenta una burbuja interna acumulada. Este fragmento de restricción *Pst*I de 3,6 kb fue identificado por electroforesis bidimensional en geles de agarosa y aislado de un gel preparativo.

Figure: Electron microscopy of a DNA fragment from the *Escherichia coli* plasmid pPI21 containing an internal bubble. This 3.6-kb *Pst*I restriction fragment was identified by two-dimensional agarose gel electrophoresis and isolated from a preparative gel.

Reproducción Celular Cell Proliferation

CONSUELO DE LA TORRE GARCÍA-QUINTANA
Jefe de Grupo/*Group Leader*

JOSÉ LUIS CÁNOVAS PALACIO-VALDÉS
Investigadores/Senior Investigators

JUAN FRANCISCO GIMÉNEZ ABIÁN(Desde V-1996)
GONZALO GIMÉNEZ MARTÍN
Investigadores Asociados/Associate Researchers

ALMA LETICIA BORBOA DE CUETOS (Hasta VI-1995)
HELVIA ROSA PELAYO BENAVIDES (Desde X-1995)
B. Predoctorales/Graduate Students

MARGARITA CARRASCOSA CEBRIÁN
JOSÉ LUIS MARCILLA CABANILLAS
Personal Técnico/Technical Staff

Palabras clave: Genotoxicidad, ensayo cometa, proliferación celular en plantas, organizador nucleolar, capacidad replicativa, topoisomerasa II, cromosoma.

Ensayos de genotoxicidad en meristemos de plantas

El desarrollo y la homologación de ensayos sencillos y fiables para la detección de agentes genotóxicos es una necesidad, ya que los actuales ensayos son costosos y largos, de forma que la capacidad total de los laboratorios mundiales dedicados a ellos es deficitaria ante el ritmo de aparición de nuevos productos químicos. En este contexto, este grupo ha acortado, simplificado y adaptado a células meristemáticas de *Allium cepa* L. el llamado ensayo cometa o microelectroforesis en condiciones alcalinas de núcleos aislados, extendiendo este método eficaz de valoración de genotoxicidad a células de tejidos sólidos. Por otra parte, se ha probado la importan-

Keywords: Genotoxicity assessment, comet assay, plant cell proliferation, nucleolar organizers, competence for nuclear replication, topoisomerase II, chromosome.

Genotoxicity assessment in plant meristems

The development and homologation of assays for genotoxic agents in plants is sorely needed since the present assays are time-consuming and expensive, so that the capacity of all labs involved world-wide is exceeded by the rate of appearance of new chemicals. Our group has simplified and adapted the comet assay or microelectrophoresis of isolated nuclei in high alkaline conditions to plant cells, so that this method can now be easily applied to cells from solid tissues without losing resolution. Moreover, the importance of testing concentrations which depress without blocking cell proliferation has been made evident when studying the genotoxic effects of heavy metals on plant cells and their synergic effect on direct clastogens.

cia que tiene la realización de los ensayos de genotoxicidad a concentraciones que depriman sin bloquear proliferación celular y los efectos sinérgicos que se producen entre clastógenos directos y metales pesados en estas condiciones.

Regulación de la proliferación celular

Se ha determinado, mediante hibridación *in situ* con sonda fluorescente, la presencia de cinco regiones conteniendo los genes que codifican para el rDNA en el cariotipo de *Allium cepa* L., ubicadas en sólo dos pares de cromosomas (6 y 8). Además, se ha demostrado que, en células en las que el número máximo de nucleolos es dos, los organizadores nucleolares que no forman nucleolo mantienen íntegra su capacidad para desarrollarlo al ser separados, por acción de agentes multipolarizantes, en núcleos distintos dentro de una misma célula. Se ha determinado que la dominancia de unos organizadores sobre otros se adquiere por competencia en telofase, en el momento de la nucleogénesis, y que se mantiene de forma permanente durante todo el ciclo siguiente.

Se ha establecido que sólo tres de los cuatro cromosomas que llevan organizador nucleolar en el genoma de *Allium cepa* L. y otros dos cromosomas de otro par llevan secuencias que capacitan al núcleo en que se encuentran confinados a iniciar replicación en presencia del estímulo adecuado.

La de-represión de transcripción conseguida por hipometilación experimental del genoma (incorporación de 5-azacitidina en el DNA) se ha visto ir acompañada por fallos en la segregación de cromátidas en anafase. Ello conduce a desacople entre los ciclos de división cromosómica y citoplásmica que pueden llevar a comprometer la viabilidad celular.

Se han analizado los distintos efectos que la inhibición de la enzima topoisomerasa II tiene a nivel de la biología del cromosoma. El tipo de efecto provocado guarda estrecha relación con el momento en que la proteína es inhibida. Así, 1) provoca una parada en G₂ cuando la proteína es inhibida durante ese periodo; 2) impide la separación de los ejes cromatídicos hermanos cuando la inhibición tiene lugar en el paso profase-prometafase; 3) impide una correcta condensación cromosómica si la inhibición tiene lugar durante profase y/o prometafase; 4) interfiere de forma negativa con la separación anafásica de las cromátidas hermanas cuando es inhibida durante la transición metafase-anafase.

Regulation of cell proliferation

The presence of five nucleolar organizer regions containing rDNA in only two chromosomal pairs of the Allium cepa L. karyotype has been proved by fluorescence in situ hybridization. Cells developing a maximum figure of two nucleoli per nucleus were seen to possess all their nucleolar organizers potentially active in these meristems. Thus, the repressed NORs formed nucleoli if separated in a different nucleus from the dominant NORs. Dominance of one NOR over other was seen to be achieved in telophase, during nucleogenesis, and to be kept throughout the full next cycle.

It has been established that only three out of the four chromosomes carrying the nucleolar organizers and another two chromosomes of the Allium cepa L. genome possess DNA domains which gives the competence to initiate replication in the presence of the proper stimulus to the nucleus where they are confined.

The de-repression of transcription brought about by hypomethylation of DNA (induced by 5-azacytidine incorporation) is accompanied by failures in the chromatid segregation process taking place in anaphase. This leads to the uncoupling of the chromosomal and cell division cycles which is able to compromise cell viability.

It has been analyzed the different effects that the inhibition of topoisomerase II has on the biology of chromosomes. Each effect is closely related to the time where its inhibition took place: 1) it arrests cells in G₂ when inhibited during this period; 2) its inhibition blocks the separation of sister chromatid cores when taking place in the prophase to prometaphase transition; 3) it interferes with chromosome condensation when taking place during prophase and/or prometaphase; and 4) it blocks the separation of sister chromatids in anaphase when the inhibitors are applied during the metaphase to anaphase transition.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB93-0167. (1995-1997).
- C E, Proyecto BIOTECH - RTD PL96-0275. (1996-1999).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Alma Leticia Borboa de Cuetos. Ensayos de genotoxicidad en células meristemáticas de *Allium cepa* L.: efectos de Zn y Cd. Universidad Autónoma de Madrid, 1995. Directora: C. de la Torre.

Publicaciones/Publications

- Giménez-Abián, J. F., and Clarke, D.J. (1995). Ciclo celular. Puntos de contrastación. *Invest. Ciencia* 226, 40-41.
- Giménez-Abián, J.F., Clarke, D.J., Mullinger, A.M., Downes, C.S., and Johnson, R.T. (1995). A post-prophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. *J. Cell Biol.* 131, 7-17.
- Leyton, D., Mergudich, D., De la Torre, C., and Sans, J. (1995). Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. *Cell Prolif.* 28, 481-496.
- Borboa, A.L., and De la Torre, C. (1996). The genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa* L. root meristematic cells. *New Phytol.* 134, 481-486.
- Downes, C.S., Clarke, D.J., Tönnies, H., Giménez-Abián, J.F., Mullinger, A.M., Sperling, K., and Johnson, R.T. (1996) Generation of partial monosomies in human somatic cells by inhibition of mitotic topoisomerase II. In *Chromosome Segregation and Aneuploidy*, A. Abbondandolo, A. B. K. Vig and R. Rosi, eds, pp. 133-137.
- Giménez-Abián, M.I., Giménez-Abián, J.F., Cuadrado, A., Pelayo, H.R., Giménez-Martín, G., and De la Torre, C. (1996) The development of intraspecific dominance in some nucleolar organizer regions of plants. In *Plant Cell Proliferation and its Regulation in Growth and Development*, J. Bryant ed. (Sussex: John Wiley & Sons), pp. 28-35.
- Panzera, F., Giménez-Abián, M.I., López-Sáez, J.F., Giménez-Martín, G., Cuadrado, A., Shaw P.J., Beven, A.F., Cánovas, J.L., and De la Torre, C. (1996). Nucleolar organizer expression in *Allium cepa* L. chromosomes. *Chromosoma* 104, 12-19.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Navarrete, M.H., Carrera, P., de Miguel, M., and de la Torre, C. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plant cells. *Mutation Res.* (en prensa, 1997).
- Panzera, F., Giménez-Abián, M.I., López-Sáez, J.F., Giménez-Martín, G., Cuadrado, A., Cánovas, J.L., and de la Torre, C. (1997). Competence for nuclear replication and the NOR-chromosomes of *Allium cepa* L. *Eur. J. Cell Biol.* 72, 9-12

Proliferación y Diferenciación de Células Mieloides

Proliferation and Differentiation of Myeloid Cells

PATRICIO ALLER TRESGUERRES

Jefe de Grupo / *Group Leader*
Investigador / *Senior Investigator*

CONCEPCIÓN PÉREZ MARTÍN (Hasta V-1996)

Investigadora Asociada/*Associate Research*

NURIA E. VILABOA DÍAZ (Hasta V-1995)

LAURA GARCÍA BERMEJO

M^a DEL ALBA GALÁN GARCÍA (Desde X-1996)

B. Predoctorales / *Graduate Students*

ELENA DE BLAS BROTONS

Personal Técnico / *Technical Staff*

Palabras clave: Drogas anti-tumorales, estrés, diferenciación, apoptosis, células leucémicas.

Nuestro grupo desarrolla un programa de investigación sobre el control de la proliferación, diferenciación y muerte 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.

Estamos especialmente interesados en el estudio de la respuesta celular a agentes antitumorales. Ello incluye: agentes alquilantes (cisplatino, mitomicina C y busulfán), e inhibidores de DNA topoisomerasa II con distintos mecanismos de acción (inhibidores clásicos, tales como etoposido, amsacrina, adriamicina y mitoxantrona, que estabilizan los complejos DNA-topoisomerasa en forma covalente y causan roturas en el

Keywords: Antitumour drugs, stress, differentiation, apoptosis, leukemia cells.

We are currently working on the control of proliferation, differentiation and death 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 study of the cellular response to the action of antitumour drugs, specially DNA alkylating agents (such as cisplatin, mitomycin C and busulfan) and DNA topoisomerase II inhibitors with different mechanism of action (namely "classic" inhibitors, such as etoposide, amsacrine, adriamycin and mitoxantrone, which cause DNA-topoisomerase cleavable complex stabilization and DNA breakage; and new, non-clastogenic agents, such as bisdioxopiperazines or ICRFs). The project includes: (1) The analysis of intracellular ionic chan-

DNA; y nuevos agentes de acción no clastogénica, como bis-dioxopiperazinas o ICRFs). El proyecto comprende: (1) Análisis de cambios iónicos intracelulares, tales como alteración de pH y movilización de Ca^{2+} ; y alteración de actividades proteína quinasa. (2) Estudio de la expresión de genes (tales como *c-fos* y *c-jun*, *c-myc*, *bcl-2* and *bax*, *waf-1*) y de la actividad de factores transcripcionales (AP-1, NF- κ B y EGR-1) que pueden regular la inducción o condicionar la susceptibilidad a la diferenciación y/o apoptosis. (3) Estudio de la posible implicación de p53 en la susceptibilidad de células mieloides a la apoptosis, utilizando células U-937 (nulas para p53) transfectadas con este antioncogén. (4) Estudio de la relación entre bloqueo de ciclo celular y disparo de apoptosis. Ello implicará el análisis de complejos ciclinas/quinasa-cdc, y cambios en fosforilación de retinoblastoma (pRb). Y (5) caracterización de diferencias entre muerte apoptótica y la recientemente descrita "muerte mitótica" (o "catástrofe mitótica").

Además, estamos caracterizando la regulación del proceso de muerte celular causado por agentes de estrés típicos, tales como hipertermia y cadmio; así como la posible implicación de proteínas de estrés (HSP70 y HSP27) en la susceptibilidad de células leucémicas mieloides a la apoptosis.

ges, such as pH alteration and Ca^{2+} mobilization; and changes in protein kinase activities. (2) The study of the expression of genes (such as *c-jun* and *c-fos*, *c-myc*, *bcl-2* and *bax*, *waf-1*) and the activity of transcription factors (AP-1, NF- κ B and EGR-1) that may regulate the induction or the susceptibility of myeloid leukemia cells to differentiation and/or apoptosis. (3) The study of the possible implication of the p53 antioncogen in the susceptibility of myeloid leukemia cells to drug-induced apoptosis. With this aim p53-transfected U-937 cells (which originally are p53-null cells) will be used. (4) The study of the relationships between cell cycle blockade and trigger of apoptosis. This aspect will include the analysis of cyclin/cdc kinase complexes, as well as alterations in retinoblastoma (pRb) phosphorylation. And (5) characterization of differences between apoptotic death and the recently described "mitotic death" (or "mitotic catastrophe").

In addition, we are studying the regulation of cell death caused by typical stress agents, such as heat-shock and cadmium; as well the possible involvement of stress proteins (HSP70 and HSP27) in the susceptibility of myeloid leukemia cells to apoptosis.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGYCIT, PB910062. (1992-1995).
- FISS, 94/0008-01. (1994-1996).
- CAM, AE00419/95. (1995).
- DGICYT, PB940063. (1995-1998).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- Nuria Elda Vilaboa Díaz. Expresión de genes de estrés y de proteínas de filamentos intermedios en células leucémicas mieloides humanas. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Director: P. Aller Tresguerres.
- Concepción Pérez Martín. Activación y diferenciación de células leucémicas mieloides por inhibidores de DNA topoisomerasas. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Director: P. Aller Tresguerres.

Publicaciones/*Publications*

- García-Bermejo, L., Vilaboa, N.E., Pérez, C., De Blas, E., Calle, C., and Aller, P. (1995). Modulation of HSP70 and HSP27 gene expression by the differentiation inducer sodium butyrate in U-937 human promonocytic cells. *Leukemia Res.* 19, 713-718 (1995).
- Leal, M.A., Aller, P., Mas, A., and Calle, C. (1995). The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on insulin binding, insulin receptor mRNA levels and isotype RNA pattern in U-937 human promonocytic cells. *Exp. Cell Res.* 217, 189-194.
- Pérez, C., Vilaboa, N.E., García-Bermejo, L., Pelayo, F., De Blas, E., and Aller, P. (1995). Differentiation of human myeloid leukemia cells by DNA topoisomerase inhibitors. In *Challenges of Modern Medicine*. Vol. 10: Differentiation Therapy. S. Waxman, ed. (Rome: Ares-Serono Symposia Publications), pp. 341-345.
- Rubio, M.A., López-Rodríguez, C., Nueda, A., Aller, P., Armesilla, A.L., Vega, M.A., and Corbí, A. (1995). Granulocyte/macrophage colony stimulation factor, phorbol ester, and sodium butyrate induce the CD11c integrin gene promoter activity during myeloid cell differentiation. *Blood* 86, 3715-3724.
- Vilaboa, N.E., Calle, C., Pérez, C., De Blas, E., García-Bermejo, L., and Aller, P. (1995). cAMP increasing agents prevent the stimulation of heat-shock protein 70 (*HSP70*) gene expression by cadmium chloride in human myeloid cell lines. *J. Cell Sci.* 108, 2877-2883.
- Ballester, A., Pérez, C., Aller, P., and Mata, F. (1996). Differentiation of U-937 promonocytic cells with mitomycin C or cis-diamminedichloroplatinium II. *Int. J. Cancer* 65, 791-795.
- Leal, M.A., Aller, P., and Calle, C. (1996). Effect of dexamethasone on insulin receptor mRNA levels, RNA stability and isotype RNA pattern in U-937 human promonocytic cells. *J. Endocrinol. Invest.* 19, 530-534.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- Campion, J., Aller, P., Davila, N., Carranza, M.C., De Miguel, R., and Calle, C. Tissue-specific modulation of insulin receptor mRNA levels in adrenaline-treated cells. *Mol. Cell. Biochem.* (en prensa, 1997)
- Pérez, C., Vilaboa, N.E., García-Bermejo, L., De Blas, E., Creighton, A.M., and Aller, P. Differentiation of U-937 promonocytic cells by etoposide and ICRF-193, two antitumour DNA topoisomerase II inhibitors with different mechanism of action. *J. Cell Sci.* (en prensa, 1997).
- Vilaboa, N.E., García-Bermejo, L., Pérez, C., De Blas, E., Calle, C., and Aller, P. Heat-shock and cadmium chloride increase the vimentin mRNA and protein levels in U-937 human promonocytic cells. *J. Cell Sci.* (en prensa, 1997).

Regulación de Expresión de Genes Eucariotas

Eukaryotic Gene Expression

MIGUEL ANGEL VIDAL CABALLERO

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

JON SCHOORLEMMER (HASTA XII-1996)

B. Postdoctoral/Postdoctoral Fellow

ROSA DE LA COLINA MONTERO (HASTA VII-1995)

FELIPE WERE EDUARDO

RODRIGO MARTÍNEZ MAZA (HASTA II-1996)

EMILIANO GARCÍA PIZARRO (DESDE X-1996)

B. Predoctorales/Graduate Students

Palabras clave: Ratones transgénicos, queratina 8, Polycomb, represión.

Nuestro laboratorio estudia los mecanismos por los que se establecen los estados transcripcionales activos e inactivos, así como su perpetuación a través de sucesivas divisiones celulares. Por un lado, estudiamos la expresión de una región del locus de queratinas de tipo II que parece contener una región controladora de locus, asociada a funciones activadoras dominantes sobre la cromatina adyacente. En un segundo proyecto hemos abordado el clonaje molecular de miembros del grupo Polycomb en ratón, presumiblemente implicados, como en *Drosophila*, en el mantenimiento de estados transcripcionales reprimidos.

Elementos de control de la queratina humana de epitelios sencillos K8 en ratones transgénicos

Hemos generado ratones transgénicos con un cósmido que contiene 34 kb del locus de la queratina K8 humana (un componente del citoesqueleto de filamentos intermedios de epitelios sencillos). Estos animales expresan el gen HK8 de

Keywords: Transgenic mice, keratin 8, Polycomb, repression.

Our laboratory is involved in the study of the mechanisms by which active/inactive transcriptional states are established and maintained through cell division. On the one hand, we are studying the expression of a region of the human type II keratin locus, which appears to harbor a locus control region, i.e. a cis acting element with dominant effects on surrounding chromatin. In a second project we set out to clone new members of the murine Polycomb group of genes, whose products are involved in the maintenance of transcriptionally repressed states.

Cis control regions of the human simple epithelial K8 gene in transgenic mice

We introduced into the germ line of mice a cosmid containing 34 kb of the human K8 locus (encoding keratin 8, a component of the keratin intermediate filament cytoskeleton of simple epithelial cells). Transgenic mice expressed the HK8 gene in an integration site-independent and copy number-dependent manner. These two rather unusual properties of transgene expression sug-

modo independiente de integración cromosómica y dependiente del número de copias del transgen. Estas dos propiedades sugieren que el fragmento genómico utilizado contiene una región controladora de locus. El subfragmento más pequeño que muestra expresión eficiente, similar a la del gen endógeno, es un segmento de 12 kb que contiene el gen junto con 1,1 kb y 3,2 kb de secuencias flanqueantes 5' y 3', respectivamente. Deleciones de este fragmento genómico muestran que elementos de control importantes se encuentran en secuencias intergénicas, particularmente en el primer intrón, y que es necesaria la cooperación entre algunos de estos elementos para la correcta expresión del transgén.

Clonaje molecular de genes del grupo Polycomb de ratón

Las proteínas del grupo *Polycomb* forman complejos multiméricos que organizan una estructura de cromatina implicada en el mantenimiento de estados transcripcionales reprimidos. Hemos intentado identificar proteínas que interactúen con M33, un homólogo murino del regulador esencial del mantenimiento del estado reprimido de genes homeóticos y de segmentación en *Drosophila*, *Polycomb* (Pc). Para ello hemos utilizado un sistema di-híbrido en levaduras, que es un sistema genético desarrollado para detectar interacciones proteína-proteína *in vivo*. De este modo hemos clonado dos cDNAs relacionados que codifican proteínas con un dominio RING finger, también presente en otras proteínas del grupo Pc, que, sin embargo, no es necesario para la interacción con M33. Hemos encontrado que M33 une estas RING proteínas a través de una región del extremo carboxilo, conservada en Pc, y que los productos de estos cDNAs, así como M33, son proteínas nucleares con actividad represora de transcripción. Hibridación *in situ* a embriones de ratón (en colaboración con C. Marcos, NIMR, Londres) muestra que la expresión de uno de los genes en estadios tempranos de desarrollo es más restringida que la de M33, localizándose exclusivamente en tubo neural. A partir del día 12,5 de desarrollo, sin embargo, los patrones de expresión son casi coincidentes. Nuestro trabajo se enfoca ahora en el estudio bioquímico de la interacción de M33 con estas proteínas, en la identificación de los dominios represores y de su mecanismo de acción, en la generación de ratones deficientes en proteínas que interactúan con M33 (en colaboración con T. Magin, Bonn) y en la identificación de nuevos componentes del grupo de proteínas Pc.

gested that a locus control region was present in the genomic fragment used. Further analysis showed 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 efficient and tissue specific expression of the transgene. Subsequent deletion analysis showed that important regulatory regions are found in intragenic sequences, particularly in the first intron, and that cooperation among some of those elements is required for appropriate expression.

Molecular cloning of murine members of the Polycomb group of genes

The products of the Polycomb group of genes (Pc-G) form multimeric complexes which organize a chromatin structure involved in maintenance of transcriptional states. We have searched for proteins interacting with M33, which is a murine homolog of Polycomb, one of the proteins that maintain repression of both homeotic and segmentation genes in *Drosophila*. We have used M33 as a bait in a yeast two hybrid system, a genetic screening system which detects protein-protein interactions *in vivo*. We have identified two related cDNAs which encode proteins containing a RING finger motif, also found in other PcG members, although it was not required for M33 interaction. M33 binds these two RING finger proteins through a region in the carboxyl end which is conserved in fly Pc. Both, M33 and its interactors are nuclear proteins that repress expression of reporter plasmids in transient transfection assays. *In situ* hybridization studies (in collaboration with C. Marcos, NIMR, London) showed that expression of one of the two genes in early embryos was localized to the neural tube, in a much more restricted pattern than that of M33. From 12.5 d.p.c. onwards, however, the expression patterns of the two genes were similar. Our current focus is to delineate the biochemical properties of the interaction among these proteins as well as their transcriptional properties, the generation of mice deficient in M33 interactors (in collaboration with T. Magin, Bonn) and the isolation of new members of repressing chromatin complexes.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— DGICYT, PB94-0089. (1995-1997).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

— Llanos Casanova. Regulación de la expresión y función de la queratina 8 humana, específica de epitelios sencillos. Universidad Autónoma de Madrid, 1995. Director: M. Vidal.

Publicaciones/*Publications*

- Casanova, L., Bravo, A., Were, F., Ramírez, A., Jorcano, J., and Vidal, M. (1995). Tissue-specific and efficient expression of the human simple epithelial keratin 8 gene in transgenic mice. *J. Cell Sci.* 108, 811-820.
- Ramírez, A., Vidal, M., Bravo, A., Larcher, F., and Jorcano, J. L. (1995). A 5'-upstream region of a bovine keratin 6 gene confers tissue-specific expression and hyperproliferation-related induction in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4783-4787.

Artículos de Divulgación/*Press Articles*

— Vidal, M. (1995). Animales transgénicos. *Fronteras de la Ciencia y la Tecnología* 10, 35-37.



Figura: Expresión en tubo neural de uno de los genes que codifica una proteína que interacciona con M33 (un homólogo murino de Polycomb), detectada por hibridación a RNA en embriones de ratón de 9,5 días de desarrollo.

Figure: Whole-mount *in situ* RNA hybridization to 9.5 d.p.c. mouse embryos showing neural tube expression of the Polycomb-like M33 interactor encoded by cDNA 8.1.

Control Transcripcional en Eucariotas

Control of Transcription in Eukaryotes

JAVIER REY CAMPOS

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

CRISTINA PÉREZ SÁNCHEZ

B. Predoctoral/*Graduate Student*

BEGOÑA TORRES BELINCHÓN

M^a DEL CARMEN ARIAS DE LA FUENTE
Pregraduados/*Undergraduate Students*

LUIS ROIZ PAZOS (DESDE III-1996)

Personal Técnico/*Technical Staff*

El objetivo principal de nuestro laboratorio es el estudio de los mecanismos de control transcripcional en eucariotas superiores. Nuestro trabajo se desarrolla actualmente en dos líneas de investigación relacionadas. Por un lado estamos llevando a cabo la caracterización de los mecanismos de activación transcripcional en el hígado de los mamíferos. La otra línea de investigación que estamos desarrollando, pretende caracterizar estructural y funcionalmente un nuevo factor de transcripción específico.

Control de la transcripción en el hígado de los mamíferos

El análisis de las regiones implicadas en el control de la transcripción de un gran número de genes hepáticos ha permitido identificar factores de transcripción que están implicados en la expresión diferencial de estos genes. De estos, los mejor

Our main concern is the study of the molecular mechanisms of transcriptional control in higher eukaryotes. Currently, our works focus on two related lines of research. On the one hand, we want to characterise the mechanisms of transcriptional activation in the liver of mammals. The other topic we are addressing in the laboratory is the characterisation, both at the structural as well as the functional level, of a novel specific transcription factor.

Control of transcription in the liver of mammals

The analyses of the regulatory regions of many liver-specific genes led to the identification of transcription factors important for the differential expression of these genes. Among the best characterised are the transcription factors HNF1, vHNF1, HNF3 α , y β , HNF4, C/EBP, NF-IL6, DBP, and LAP. We have been using the human liver-specific gene C4BPA, which encodes the α -chain of the regulator of complement activation C4b-Binding protein,

caracterizados son los factores HNF1, vHNF1, HNF3 α , y β HNF4, C/EBP, NF-IL6, DBP y LAP. Nosotros hemos utilizado el gen humano C4BPA, que codifica la cadena α de la proteína reguladora de actividad del complemento C4b-Binding Protein, como gen modelo para el estudio de los mecanismos de control transcripcional en el hígado. Hemos encontrado que la expresión de C4BPA depende fuertemente de los factores de transcripción hepáticos HNF1, HNF3, y factores de la familia C/EBP, así como también de otros factores de distribución más general como NF1. Actualmente estamos interesados en determinar el mecanismo por el cual estos factores de transcripción son capaces de activar la transcripción. Nuestro trabajo se centra en los factores de transcripción HNF1 y vHNF1. 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. Estos dos factores muestran una fuerte homología en las regiones de la proteína implicadas en la unión específica al DNA. Sin embargo, la homología en las regiones implicadas en el proceso de activación de la transcripción es considerablemente menor, lo que podría explicar las diferencias entre estos dos factores en sus capacidades de transactivación. Por otro lado, queremos conocer qué factores generales de transcripción están implicados en el proceso de activación de la transcripción por HNF1 y vHNF1. Estos estudios nos permitirán abordar el análisis de los fenómenos de cooperación funcional entre dos o más factores de transcripción que reconocen sitios próximos dentro de una misma región reguladora.

FHX, un nuevo factor de transcripción de la familia Fork-head

En el laboratorio hemos identificado un nuevo factor de transcripción, FHX, perteneciente a la familia *Fork-Head*, que muestra una expresión preferencial en hígado fetal respecto al hígado adulto. Además, mediante experimentos de hibridación *in situ*, hemos encontrado que FHX se expresa, durante el desarrollo embrionario, en la epidermis, epitelio intestinal, sistema nervioso, epitelio pulmonar y en la médula ósea. Experimentos de protección frente a RNasas realizados con RNA de órganos de ratón indican que, en el adulto, FHX muestra una tasa de expresión alta en el corazón y en el cerebro. Actualmente estamos llevando a cabo experimentos para conocer la secuencia de DNA reconocida por FHX que nos permitirán la identificación de genes potencialmente regulados por este factor de transcripción.

as our model for the study of the mechanisms of transcriptional control in the liver. We have found that the expression of C4BPA is strongly dependent of the hepatic transcription factors HNF1, HNF3, and factors of the C/EBP family, as well as other more generally distributed factors as NF1. We are now interested in determining how transcription factors actually activate transcription. To this end, we are using the highly related transcription factors HNF1 and vHNF1. We are addressing the characterisation of the specific domains of HNF1 and vHNF1 implicated in the transactivation activity. These two factors show strong homology in the N-terminal region, involved in specific DNA binding. The homology drops towards the C-termini of the molecules, known to play some role in the activation of transcription. These differences could account for the different capacities of HNF1 and vHNF1 for transcriptional activation. Other aspect we want to address is the identification of the general transcription factors involved in the activation of transcription by HNF1 and vHNF1. These studies will eventually allow us to approach the analyses of functional synergy phenomena between two or more transcription factors bound to the same regulatory region.

FHX, a novel transcription factor of the Fork-Head family

We have identified a novel Fork-Head related transcription factor, FHX, which is preferentially expressed in foetal liver versus adult liver. *In situ* hybridisation experiments showed that FHX is also expressed, during embryonic development, in the epidermis, nervous system, intestine y lung epithelia, and bone marrow. In the adult mouse, RNase protection experiments showed high expression levels of FHX in the brain and heart. Currently we are involved in the characterisation of the DNA sequence specifically recognised by FHX and in the identification of genes potentially regulated by this factor.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PB93-0312. (1994-1997).
- CAM, (Acción Especial), AE00284/95. (1995).
- CSIC, (Acción Especial). (1996).

Publicaciones/*Publications*

- Arenzana, N., Rodríguez de Córdoba, S., and Rey-Campos, J. (1995). The hepatic activity of the promoter of the gene coding for the α -chain of C4b-binding protein (*C4BPA*) requires HNF1. *Biochem. J.* **308**, 613-621.

Biología Celular y del Desarrollo de Nematodos

Developmental and Cellular Biology of Nematodes

CLARA GODAY BAYLINA

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigadora/*Senior Investigator*

ROSARIO ESTEBAN FERNÁNDEZ

B. Postdoctoral/*Postdoctoral Fellow*

YANINA PANZERA

B. Predoctoral/*Graduate Student*

MERCEDES JIMÉNEZ SARMIENTO

Personal Técnico/*Technical Staff*

Nuestro proyecto se centra en identificar y caracterizar proteínas cromosómicas y proteínas relacionadas con el huso implicadas en la organización y/o segregación de los cromosomas de eucariotas. Para ello usando una batería de anticuerpos monoclonales hemos identificado antígenos que en células del nematodo *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. Hemos investigado, además, la conservación y la distribución celular de dichos antígenos en distintos organismos, tales como,

The aim of the project is to identify and characterize chromosomal and spindle-related proteins involved in chromosome organization and/or segregation in eucariotic cells. Using monoclonal antibodies we have identified antigens which in the nematode Parascaris associate to: 1) heterochromatic chromosomal regions, 2) centromeric chromosomal regions, 3) spindle poles, and 4) ring-like equatorial structures implicated in cytokinesis. By immunofluorescence and immunoblotting techniques, 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 antibodies have been used to screen Parascaris, S. pombe, Drosophila and human cDNA expression libraries. We are currently carrying out

Saccharomyces cerevisiae, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y mamíferos. Los anticuerpos se han empleado para determinar los genes codificantes a partir de librerías de expresión de cDNA de *Parascaris*, *S. pombe*, *Drosophila* y humana. Actualmente estamos caracterizando molecularmente los genes aislados en los diferentes sistemas.

Estamos también interesados en entender el comportamiento de los cromosomas que están sometidos a un fenómeno de "imprinting" en el insecto *Sciara*. En concreto, hemos analizado la meiosis masculina mediante técnicas de inmunofluorescencia para caracterizar citológicamente la formación del huso y el proceso de eliminación diferencial de cromosomas. Hemos caracterizado el proceso de eliminación de los cromosomas paternos durante la meiosis I así como la no-disyunción del cromosoma X materno durante la meiosis II.

the molecular characterization of the encoding genes that we have isolated in the different systems.

We are also interested in the peculiar chromosome behavior due to the existence of genomic imprinting in the insect *Sciara*. In particular, we have analyzed male meiotic divisions using immunofluorescence techniques to cytologically characterize spindle formation and differential chromosome elimination. In this respect, we have investigated paternal chromosome elimination during meiosis I and non-disjunction of X maternal chromosome during meiosis II.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PB93-0164. (1994-1997).
- UE, nº CI1*-CT94-0071. (1995-1997).
- Acción Integrada España/Italia. nº 66B. (1996).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- M.R. Esteban. Eliminación de heterocromatina y organización del centrómero en el nematodo *Parascaris univalens*. Universidad Autónoma de Madrid, 1995. Director: C. Goday.

Publicaciones/*Publications*

- Esteban, M. R.; Giovinazzo, G., and Goday, C. (1995). Chromatin diminution is strictly correlated to somatic cell behavior in early development of the nematode *Parascaris univalens*. *J. Cell Sci.* 108, 2393-2404.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- Esteban, M.R., Campos, M.C.C., Perondini, A.L.P., and Goday, C. Male spermatogenesis and chromosome elimination in *Sciara ocellaris*. *J. Cell Sci.* (en prensa, 1997).

Citogenética Molecular de Dípteros

Molecular Cytogenetics of Diptera

JOSÉ LUIS DÍEZ CORTES
Jefe de Grupo/*Group Leader*

LUISA MARÍA BOTELLA CUBELLS
Investigadores/Senior Investigators

GLORIA MORCILLO ORTEGA
Investigadora Asociada/Associate Research

EDUARDO GORAB
JOSÉ LUIS MARTÍNEZ GUITARTE
CRISTINA SANZ HERMIDA (DESDE X-1996)
B. Predoctorales/Graduate Students

JOSEFA FERNÁNDEZ-CABRERA BAZÁN
AMELIA PARTEARROYO LACABA
Personal Técnico/Technical Staff

Estudios sobre la expresión génica en células politenizadas de *Chironomus* y *Drosophila*

La actividad principal del grupo se centra en algunas cuestiones relacionadas con la expresión génica desde la perspectiva y posibilidades que ofrecen los cromosomas politénicos de Dípteros. Estos cromosomas aportan una referencia citológica singular de la organización del cromosoma interfásico, que resulta discernible en términos de unidades subcromosómicas. En particular, permiten identificar los estados de activación/represión de loci cromosómicos específicos. Esto hace posible desarrollar estudios *in situ* que pueden orientar y complementar el análisis a nivel molecular.

Studies on gene expression in polytenized cells of Chironomus and Drosophila

The main research of the group deals with some aspects of gene expression from the view and experimental possibilities of dipteran polytene chromosomes. In this model, the organisation of genetically active chromosomes is discernible in terms of subchromosomal units. In particular, they allow to identify the activation/repression states of specific chromosomal loci. This makes possible to perform "in situ" studies which may focus or complement the molecular analysis.

Estudio de los "puffs" teloméricos inducibles por heat-shock en *Chironomus thummi* (TBRs)

La formación de TBRs es un fenómeno peculiar solamente observable, hasta el momento, en algunas especies del grupo *Chironomus thummi*. El interés que ofrece su estudio se relaciona con el hecho de que en su inducción participan las secuencias asociadas al telómero (TAS) que en *Chironomus* parecen ser propiamente las secuencias teloméricas, es decir, las responsables de la función telomérica. Por otro lado, los TBRs constituyen un componente de la respuesta al *heat-shock* que presenta considerable interés ya que, junto a los *hsrw* de *Drosophila*, podrían representar elementos universales de esta respuesta solamente detectados hasta ahora en aquellos sistemas que poseen cromosomas politénicos.

Los planteamientos concretos que se siguen en el laboratorio son los siguientes:

- Caracterización molecular de las TAS mediante el *screening* de una genoteca genómica obtenida por microclonaje del telómero IIIr de *C. thummi*. El objetivo principal de este proyecto es identificar los elementos reguladores de la respuesta al choque térmico y sus relaciones con el bloque de TAS.

- Continuación del estudio de los TBRs en sus vertientes morfológica y fisiológica con el fin de profundizar en su posible equivalencia con los genes *hsrw* de *Drosophila*: Análisis de la conducta de *puffing* de los TBRs; frecuencia de inducción en distintos telómeros, ocurrencia en distintas poblaciones etc.

Inmunolocalización de proteínas cromosómicas relacionadas con la transcripción

En estos estudios, se utilizan los cromosomas politénicos para definir de forma precisa la localización cromosómica de proteínas implicadas en procesos relacionados con la transcripción. Esta aproximación resulta inviable, generalmente, en células interfásicas ordinarias. La hipótesis subyacente es que la ubicación cromosómica de una proteína proporciona un primer nivel de información sobre su posible función. En estos estudios se utilizan anticuerpos poli o monoclonales frente a proteínas muy conservadas evolutivamente cuya función nuclear es desconocida o está insuficientemente definida. Con estos anticuerpos se puede analizar la distribución de

Study of telomeric puffs Heat-Shock heat-shock inducible in *Chironomus thummi*

The formation of telomeric puffs induced by heat-shock is a peculiar phenomenon whose observation is at present restricted to some species of the *C. thummi* group. The interest of this research lies in the involvement of telomeric associated sequences (TAS) in the puff formation. In *Chironomus*, TAS seem to be the actual telomeric sequences, that is, directly involved in the telomere function. On the other hand, TBRs are particularly interesting components of the, Heat-Shock response since they may represent, along with *hsrw* genes of *Drosophila*, universal elements of this response only detected up to now in organisms having polytene chromosomes.

The following approaches have been carried out in the laboratory:

- Characterisation of the molecular organisation of the TAS

through the screening of a genomic library obtained by microcloning of the IIIr telomere of *C. thummi*. The main objective is the identification of control elements responsible for the thermal inducibility of the TAS block.

- Continuation of the TBRs study at cytological and physiological levels: Puffing behaviour, inducibility in different telomeres, different *Chironomus* populations etc.

Immunolocalization of transcription-related chromosomal proteins

In this research, polytene chromosomes allow the precise localisation of proteins involved in the transcription process. This approach is not possible in normal interphase cells. The underlying hypothesis is that chromosomal allocation may represent a primary level of information on its function. Mono or polyclonal antibodies against very conserved proteins are commonly used. Work is focused on proteins whose nuclear function is either unknown or poorly understood. Immunostaining experiments are performed on polytene chromosomes from cells showing a differential pattern of gene expression induced by experimental treatments or associated to larval development. Different group of proteins have been studied or are under investigation: Heat-shock proteins (specially 90 kDa and 70 kDa; human autoantigens (KU and LA) and nucleolar proteins (B23, L15, Fibrilarin) are the most representatives ones

los antígenos en los cromosomas mediante técnicas inmunocitoquímicas en M/O o M/E. Generalmente se utilizan cromosomas de células que muestran patrones diferenciales de expresión génica inducidos por tratamientos experimentales o bien asociados al desarrollo larvario. Diversos grupos de proteínas están siendo estudiados en la actualidad: Proteínas *Heat-Shock* (especialmente 90 kDa y 70 kDa); autoantígenos humanos (complejos KU y LA) así como proteínas relacionadas con la actividad nucleolar. (B23,L15,fibrilarina).

Otros proyectos

Durante este bienio, se han realizado dos proyectos cuya continuación inmediata no se tiene prevista. El primero está relacionado con la regulación de los Anillos de Balbiani mediante el estudio de la interacción los productos codificados en los propios Brs (exon 3') con secuencias reguladoras de los mismos. El segundo, consistió en la caracterización del locus III-D1 en *Chironomus thummi* regulado por ecdisona que se encuentra en fase de publicación.

Por otro lado, se ha iniciado un nuevo proyecto que consiste en el análisis mediante el "cross-linking" con psoraleno de la estructura de la cromatina en relación con su actividad transcripcional. Se trata de una colaboración con el Dr. J.M. Sogo del ETH de Zurich.

Other projects

During this period we have worked out two projects whose continuation is not foreseen. The first one is connected with Balbiani Ring regulation by the analysis of the interaction of its own gene product (3' exon) with the control elements of the BR genes. The second was the characterization of the ecdyson-regulated locus III-D1 in *C. thummi*.

On the other hand, a new project, on the analysis of chromatin structure in relation to its transcriptional activity using psoralen cross-linking has been initiated in collaboration with Dr. Sogo at ET (Zurich)

Organismos Financiadores/Funding Agencies

— DGICYT, PB 94-0024. (1995-1998).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

— Eduardo Gorab. Análisis del dominio cromosómico III-D1 de *Chironomus thummi*. Universidad Autónoma de Madrid, 1996. Director: J.L. Díez Cortes.

Publications/Publications

- Gorab, E.; Lacoba, M.G., and Botella, L.M. (1995). Structural constraints in expansion segments from a midge 26 S DNA. *Mol. Evol.* **41**, 1016-1021.
- Botella, L.M., and Nieto, A. (1996). The C-terminal DNA-binding domain of *Chironomus* BR gene products shows preferential affinity for (dA.dT)-rich sequences. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 422-427.
- Gorab, E.; Botella, L.M.; Quinn, J.P.; Amabis, J.M., and Díez, J.L. (1996). Ku-related antigens are associated with transcriptionally active loci in *Chironomus* polytene chromosomes. *Chromosoma* **105**, 150-157.
- Morcillo, G., and Díez, J.L. (1996). Telomeric puffing induced by heat-shock in *Chironomus thummi*. *J. Biosci.* **21**, 247-257.

Biología del Desarrollo de *Drosophila*

Developmental Biology of Drosophila

LUCAS SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

BEGOÑA GRANADINO GOENECHEA (HASTA VI-1996)
LUIS VICENTE HERNÁNDEZ
Investigadores Asociados/*Associate Researchers*

LUIZ OTAVIO FERRAZ PENALVA (HASTA VI-1996)
M^a CARMEN DOÑORO VÁZQUEZ (DESDE VI-1996)
PEDRO PABLO LÓPEZ CASAS
M^a FERNANDA RUIZ LORENZO
B. Predoctorales/*Graduate Students*

ROSARIO DE ANDRÉS MONTES
DOLORES MATEOS MOYA
Personal Técnico/*Technical Staff*

El proyecto se centra en el análisis de los mecanismos que regulan la expresión génica durante el proceso ontogenético, así como la evolución de estos mecanismos de control:

I. El gen *scute* (*sc*), un miembro del complejo *achaete-scute* de *Drosophila melanogaster*, tiene una dualidad de función: la función *sisterless-b* (*sis-b*) requerida para determinación sexual y compensación de dosis génica, y la función *scute* (*sc*) la cual esta involucrada en neurogenesis. Se ha aislado y caracterizado el gen *scute* (*sc*) de *Drosophila subobscura*. Este gen carece de intrones y codifica para un único transcrito de 1,7 kb, el cual es ligeramente mayor que el de *D. melanogaster* (1,6 kb). La proteína *Sc* de *D. subobscura* es ligeramente

The aim of the project is the understanding of the mechanisms that regulate gene expression during ontogenetic processes, as well as the evolution of these mechanisms of control:

I. The scute (sc) gene, a member of the achaete-scute complex of Drosophila melanogaster, has dual functions: sisterless-b (sis-b) function required for sex determination and dosage compensation, and scute (sc) function which is involved in neurogenesis. The sc homologue of Drosophila subobscura was cloned. It lacks introns and encodes a single 1.7-kb transcript slightly larger than that of D. melanogaster (1.6-kb). The Sc protein of D. subobscura is slightly larger than that of D. melanogaster (382 vs. 354 amino acids). Sequence comparison between both

mayor que la de *D. melanogaster* (382 frente 345 aminoácidos). La comparación de secuencias entre ambas especies determinó que la proteína Sc tiene altamente conservado su dominio bHLH. Fuera de este dominio, los cambios en aminoácidos no están distribuidos al azar. Existen dos dominios adicionales conservados, de 20 y 36 aminoácidos, que están cerca del extremo C-terminal. Estos dominios pueden conferir a la proteína Sc especificidad con respecto a las otras proteínas del complejo *achaete-scute*. En la región 3'-UTR, el RNA de Sc contiene secuencias poli-U que son sitios putativos de fijación de la proteína Sxl. Mediante la construcción de moscas transgénicas, se ha observado que el gen *sc* de *D. subobscura* suple la falta de función del gen *sc* de *D. melanogaster*.

II. El gen *Sex-lethal* (*Sxl*) de *Drosophila* controla los procesos de determinación sexual y compensación de dosis génica. Se ha aislado un fragmento de *Drosophila subobscura* que contiene todos los exones y los promotores temprano y tardío del gen *Sxl* de *D. melanogaster*. La expresión temprana de *Sxl* en *D. subobscura* parece estar controlada a nivel de transcripción, posiblemente por la señal X:A. En la región situada 5' del inicio de la transcripción temprana de *Sxl* hay dos regiones conservadas que posiblemente estén implicadas en la activación inicial de *Sxl* por la señal X:A. La expresión tardía de *Sxl* produce cuatro transcritos en hembras y machos. En los machos, los transcritos poseen un exón adicional el cual contiene tres codones de parada de traducción, de modo que en los machos se produce una proteína *Sxl* truncada, presumiblemente no funcional. El *Sxl* pre-mRNA de *D. subobscura* carece de la secuencia poli-U presente en el tramo de polipirimidinas del sitio 3' de "splicing" del exón específico de machos. Los intrones 2 y 3 contienen las secuencias poli-U de fijación de la proteína *Sxl*, cuya localización en el intrón 2 varía pero en el intrón 3 se conservan. La proteína *Sxl* está altamente conservada a nivel de aminoácidos en ambas especies.

III. Se ha iniciado un proyecto que tiene como objetivo el análisis de la determinación sexual y de la compensación de dosis génica en *Sciara ocellaris*. Se está aislando y caracterizando en *S. ocellaris* los genes homólogos de *D. melanogaster* implicados en determinación sexual y/o compensación de dosis génica.

species show the Sc protein to have a highly conserved bHLH domain. Outside this domain, amino acid replacements are not randomly distributed. Two additional conserved domains, of 20 and 36 amino acids, are present near the C-terminal end. They may represent domains conferring specificity upon the Sc protein with respect to other proteins of the achaete-scute complex. In its 3'-UTR region, Sc RNA contains uridine stretches, putative Sxl protein DNA-binding sites. The D. subobscura Sc protein can cooperate with other D. melanogaster bHLH proteins because D. subobscura sc supplies sis-b function when introduced into D. melanogaster transgenic flies mutant for sc.

II. *The Drosophila gene Sex-lethal (Sxl) controls the processes of sex determination and dosage compensation. A Drosophila subobscura genomic fragment containing all the exons and the late and early promoters in the Sxl gene of D. melanogaster was isolated. Early Sxl expression in D. subobscura seems to be controlled at the transcriptional level, possibly by the X:A signal. In the region upstream of the early Sxl transcription initiation site are two conserved regions suggested to be involved in the early activation of Sxl. Late Sxl expression in D. subobscura produces four transcripts in females and males. In males, the transcripts have an additional exon which contains three translational stop codons so that a truncated, presumably nonfunctional Sxl protein is produced. The Sxl pre-mRNA of D. subobscura lacks the poly-U sequence presented at the polypyrimidine tract of the 3' splice site of the male-specific exon present in D. melanogaster. Introns 2 and 3 contain the Sxl-binding poly-U stretches, whose localization in intron 2 varies but in intron 3 is conserved. The Sxl protein is fully conserved at the amino acid level in both species.*

III. *A project has been initiated whose aim is the analysis of sex determination and dosage compensation in Sciara ocellaris. To this purpose, we are searching and characterizing the genes in S. ocellaris which are homologs to the genes controlling sex determination and/or dosage compensation in D. melanogaster.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PB92-0006 (1993-1996).
- Unión Europea, CI1*-CT94-0071 (1995-1997).
- DGICYT, PB95-1236 (1996-1999).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- Luiz Otavio Ferraz Penalva. El gen *Sex-lethal* de *Drosophila subobscura*. Universidad Autónoma de Madrid, 1996. Directores: L. Sánchez Rodríguez y B. Granadino Goenechea.

Publicaciones/*Publications*

- Botella, L. M., Doñoro, C., Sánchez, L., Segarra, C., and Granadino, B.(1996). Cloning and characterization of the *scute (sc)* gene of *Drosophila subobscura*. *Genetics* 144, 1043-1051.
- Granadino, B., Penalva, L.O.F., and Sánchez, L. (1996). Indirect evidence of alteration in the expression of the rDNA genes in interspecific hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Mol. Gen. Genet.* 250, 89-96.
- Granadino, B., Penalva, L.O.F., and Sánchez, L. (1996). The gene *fl(2)d* is needed for the sex-specific splicing of transformer pre-mRNA but not for double-sex pre-mRNA. *Mol. Gen. Genet.* 253, 26-31.
- Penalva, L.O.F., Sakamoto, H., Navarro-Sabaté, A., Sakashita, E., Granadino, B., Segarra, C., and Sánchez, L. (1996). Regulation of the gene *Sex-lethal*: A comparative analysis of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila subobscura*. *Genetics* 144, 1653-1664.

Genética y Dinámica de Zonas Híbridas

Genetics and Dynamics of Hybrid Zones

EDUARDO TORROJA CAVANILLAS
Jefe de Grupo/*Group Leader*
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.

Biología Molecular de la Gametogénesis

Molecular Biology of Gametogenesis

JESÚS DEL MAZO MARTÍNEZ
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

NIEVES VALENTÍN RODRIGO
Investigadora Asociada/*Associate Research*

LUIS A. LÓPEZ FERNÁNDEZ (HASTA I-1996)
B. Postdoctoral/*Postdoctoral fellow*

EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ (DESDE XI-1996)

VÍCTOR F. GROB VILLA (HASTA IV-1996)

ÓSCAR DE LUIS JIMÉNEZ

JUAN C. ORTEGA LÁZARO

MARIO PÁRRAGA SAN ROMÁN

B. Predoctorales/*Graduate Students*

FERNANDO ESCOLAR ANTÚNEZ
Personal Técnico/*Technical Staff*

Palabras claves: Gametogénesis, expresión génica, toxicología reproductiva.

La gametogénesis en mamíferos es un proceso genéticamente controlado por medio de cascadas regulatorias de expresión génica. En estudios previos, hemos aislado y clonado diferentes genes a partir de genotecas de cDNA de ovario fetal de ratón y genotecas de sustracción de testículo prepupal. Después de secuenciación, hemos seleccionado alguno de estos genes, tanto correspondientes a genes conocidos como novedales, y analizado su expresión génica durante gametogénesis. Hemos centrado nuestra atención en aquellos que presentaban un patrón de expresión regulado durante el desarrollo conducente a la diferenciación terminal en gametos.

El papel de la poliadenilación de las regiones 3' UTR en la expresión génica específica durante gametogénesis, ha sido

Keywords: Gametogenesis, gene expression, reproductive toxicology.

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

The role of polyadenylation of the 3' UTR regions in the specific genetic expression during gametogenesis has been studied in different cases. Although we have observed that the proto-oncogene N-ras expression is independent of its possible regulatory gene

analizada en distintos casos. Para el proto-oncogen *N-ras* hemos podido comprobar que aunque su expresión es independiente de su posible gen regulador *unr*, la expresión de *unr* es regulada durante la gametogénesis a nivel de sus tres transcritos alternativos por poliadenilación diferencial. En la familia isoenzimática de la piruvato quinasa (PK), hemos podido constatar como la expresión diferencial de los genes para las isoenzimas M1 y M2 va asociada con un incremento de la cola de poliadeninas en los transcritos de M1, regulados durante espermatogénesis. La aparición de genes para: "polyA binding protein" y RNA helicasas, en las genotecas reseñadas apuntan también a la importancia de este mecanismo de regulación postranscripcional.

Hemos proseguido el análisis de la familia de genes de la fosfatasa PP2A y de su posible papel funcional como reguladores del inicio meiótico y la diferenciación en espermatogénesis. Hemos clonado diferentes nuevos genes para las subunidades reguladores de estas *protein-fosfatasas* y estamos caracterizando su funcionalidad durante la diferenciación de células germinales.

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

Como genes noveles, nos hemos centrado en los denominados *Geg-154* y *Tex-27*. *Geg-154* expresa dos transcritos: de 4 kb a bajo nivel constitutivamente y de 3,2 kb específico de testículo a partir de inicio meiótico. La ORF codifica para una polipéptido de 55 kDa. Hemos comprobado que este gen está muy conservado evolutivamente de levadura al hombre y que su producto génico después de obtener anticuerpos frente a proteínas de fusión, se localiza en regiones centrosómicas y asociado al bivalente XY durante meiosis. Mediante diversos abordajes como generación de ratones transgénicos con construcciones *anti-sense*, caracterización de genes homólogos en *Drosophila* o experimentos *in vitro*, estamos progresando en

unr, the expression of *unr* is controlled by differential polyadenylation at the level of its three alternative transcripts during gametogenesis. In the pyruvate kinase (PK) isoenzyme family, we have demonstrated that the differential expression of the genes encoding for the M1 and M2 isoenzymes is associated with an increase of the poly[A] tail in M1 transcripts, controlled during spermatogenesis. The appearance of genes for "polyA binding protein" and RNA helicases in the referred libraries point out the importance of this post-transcriptional regulatory mechanism.

We are progressing in the analysis of the phosphatase PP2A gene family and its possible functional role as a regulator of the meiosis onset and the differentiation in spermatogenesis. We have cloned different novel genes for the regulatory subunits of these protein phosphatases, and we are characterizing its functionality during germ cell differentiation.

A cDNA for the variant histone H3.3A, cloned from foetal ovary library, showed a peculiar genetic structure. This contains, in the 5' UTR region, an homologous and complementary region from the α -globine gene. The origin of such structure is probably related to the evolution of both gene families: histones and globines. The analysis of its genetic expression reveals a regulation during the development of ovogénesis and spermatogenesis, concurrent with the meiotic onset.

As novel genes, we have focused on the named *Geg-154* y *Tex-27*. *Geg-154* expresses two transcripts: 4 kb, expressed constitutively at low level, and a 3.2 kb, specific for testis after the meiotic onset. The ORF encodes for a 55-kDa polypeptide. We have proved that this gene is very well conserved during evolution from yeast to human. Its genetic product, analysed by fusion-proteins antibodies, is located in centrosomal regions and associated to the XY bivalent during meiosis. Using different techniques such as transgenic mice with antisense constructions, characterization of homologues sequences in *Drosophila*, or *in vitro* experiments, we are progressing on its functional role and regulation. We know that *Tex-27* has a preferential expression in spermatogenesis, showing a high level of conservation in mammals, and that encodes for a polypeptide containing a region that potentially binds DNA by a zinc-finger structure.

Recently, we have started a project on the development of *in vitro* culture systems of germ cells that can facilitate the molecu-

su papel funcional y su regulación. De *Tex-27* sabemos que tiene una expresión preferencial en espermatogénesis, que presenta un alto grado de conservación en mamíferos y que codifica para un polipéptido que contiene una región de posible unión a DNA por estructura *zinc-finger*.

Paralelamente, hemos iniciado recientemente un proyecto para el desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* de células germinales que puede facilitar el análisis molecular de la diferenciación gamética y al mismo tiempo servir como sistema para la generación de nuevos métodos de análisis en Toxicología Reproductiva.

Nuestro grupo da asimismo apoyo metodológico al desarrollo de proyectos de control biológico de organismos biodegradantes.

lar analysis of the gametic differentiation, and also be used as a system to generate new methods for Reproductive Toxicology analysis.

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

Figura: Inmunolocalización de la proteína GEG-154 mediante un anticuerpo generado a partir del gen clonado en una genoteca de cDNA de ovario fetal de ratón:

A - En células somáticas reconoce específicamente centrosomas.

B - Inmunofluorescencia de la misma célula con un anticuerpo anti- β -tubulina.

C - La alta expresión del gen y la aparición de un segundo transcrito en espermatogénesis se corresponde con la presencia de la proteína en la vesícula sexual de células paquítenicas correspondiente al bivalente XY.

D - Tinción del DNA de la misma célula con Hoechst 33258 donde se señala el bivalente XY (flecha).

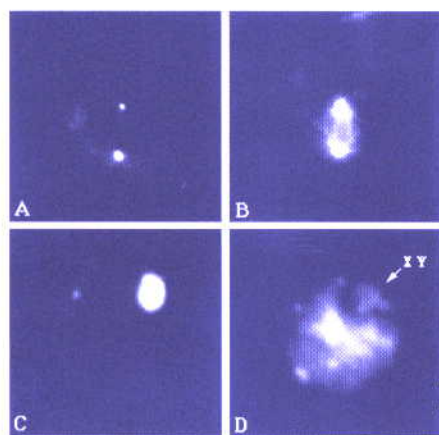


Figure: Immunolocalization of GEG-154 protein with an antibody generated from the cloned gene selected from a mouse cDNA fetal ovary library.

A - In somatic cells, centrosomes are specifically stained.

B - Immunofluorescence with an anti- β -tubulin antibody.

C - The high level of expression of this gene and the presence of a second transcript in spermatogenesis correlates with the presence of the protein in the sex vesicle of pachytene cells, corresponding to the XY bivalent.

D - DNA staining of the same cell with Hoechst 33258 where the XY body is shown (arrow).

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PB92-0063. (1996).
- DGICYT, PB95-0119.
- CE, Biotechnology, PL 960183 (Coordinador : J. del Mazo).
- CICYT, BIO96-2523-CE.
- Acciones Integradas Hispano-Italianas. MEC.
- Programa conjunto CSIC-INSERM.
- Getty C. Inst. (USA).

Tesinas de Licenciatura/*Master Thesis*

- Óscar de Luis Jiménez. Piruvato quinasa M de ratón: clonaje del cDNA para la isoforma M2 y expresión génica en gametogénesis. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Director: J. del Mazo.

Publicaciones/*Publications*

- López-Alañón, D.M., and del Mazo, J (1995). Cloning and characterization of genes expressed both in female and male mouse gametogenesis. *J. Reprod. Fertility* 103, 323-329.
- López-Fernández, L.A., López-Alañón, D.M., and del Mazo, J. (1995). Different developmental pattern of *N-ras* and *unr* gene expression in mouse gametogenic and somatic tissues *Biochim. Biophys. Acta* 1263,10-16.
- López-Fernández, L.A., and del Mazo, J. (1996). Characterization of genes expressed early in mouse spermatogenesis, isolated from a subtractive cDNA library. *Mammal. Genome* 7, 698-700.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- López-Alañón, DM., López-Fernández, L.A., Castañeda, V., Krimer D.B., and del Mazo, J. H3.3A variant histone mRNA containing an α -globin insertion: modulated expression during mouse gametogenesis correlates with meiotic onset. *DNA Cell Biol.* (en prensa, 1997).

Biología de la Reproducción

Biology of Reproduction

PEDRO ESPONDA FERNÁNDEZ
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

MERCEDES GARCÍA GILA (HASTA III-1996)
EVA HUGUET GUTIÉRREZ
MIGUEL RELLOSO CERECEDA (DESDE VI-1996)
MARIO VALENZUELA ESTRADA
B. Predoctorales/*Graduate Students*

ASCENSIÓN GONZÁLEZ DÍAZ
Personal Técnico/*Technical Staff*

Palabras clave: Epidídimo, espermatozoides, liposomas, transferencia de genes, vaso deferente.

I. Se están desarrollando análisis destinados a dilucidar algunos aspectos del mecanismo reproductivo de los animales. Aunque la mayoría de los trabajos se realizan en mamíferos *Eutheria*, también se han empleado otras especies pensando que el análisis comparativo es importante, para aclarar algunas interrogantes que plantean los fenómenos que ocurren en los mamíferos. Las líneas de investigación de este grupo pueden centrarse en torno a dos interrogantes: El primero se refiere a las funciones que imprime el tracto reproductor masculino (epidídimo, secreciones de las glándulas anexas) y femenino (oviducto), en los espermatozoides que transitan por ellos. Se han obtenido resultados que muestran que las secreciones del tracto masculino, no sólo están controladas por los andrógenos y la temperatura, sino también por factores ambientales como el fotoperiodo. Además, se ha sugerido que las secreciones de las vesículas seminales poseerían funciones más estrechamente ligadas a la fertilidad del espermatozoide, que las que hasta ahora se habrían propuesto.

Keywords: Epididymis, gene transfer, liposomes, spermatozoa, vas deferens.

Studies in order to clarify some facets of the reproductive phenomena are in progress. The foremost species analyzed belong to Eutherian mammals. Nevertheless, other groups are studied to contrast results, and to found a clue to elucidate phenomena occurring in mammals. The research interests of the group are focussed in two principal subjects: A) The first one is related to the modifications that the male (epididymis, male accessory glands) or female (oviduct) tract cause to the spermatozoa which pass through them. In this regards, results have shown that male secretions are regulated, apart from androgens and temperature, by the photoperiod. On the other hand, we suggested that seminal vesicle secretions control the spermatozoon transport through the female tract, and also the fertilizing capacity of the male gamete. B) The second question is related to the transference of foreign genes to the male gametes or to the male genital tract. Innovative procedures have been used for the in vivo transference of the genetic constructions into the male genital tract. Moreover, cationic liposomes were also utilized to accomplish the

II. El segundo interrogante está relacionado con la transferencia de genes foráneos a los gametos y al tracto reproductor masculino. Para ello, se han desarrollado métodos inéditos destinados a introducir *in vivo* diversas construcciones génicas en el tracto masculino. En ocasiones la transfección se ha realizado utilizando los genes asociados a liposomas catiónicos. Mediante técnicas moleculares e inmunológicas, se ha observado que hasta un 60% de los espermatozoides contenidos en el vaso deferente se modifican genéticamente, y que un alto porcentaje de las células epiteliales que recubren el interior de la cauda epididimaria y del vaso deferente, son capaces de expresar los genes transferidos. Este hecho es particularmente notorio cuando el gen transferido es el de la proteína GFP (proteína verde fluorescente) cuya expresión provoca una llamativa fluorescencia citoplasmática. Este último tema podría enfocarse en el futuro, hacia una modificación de la capacidad fértil del espermatozoide, y hacia el control del mecanismo de fecundación.

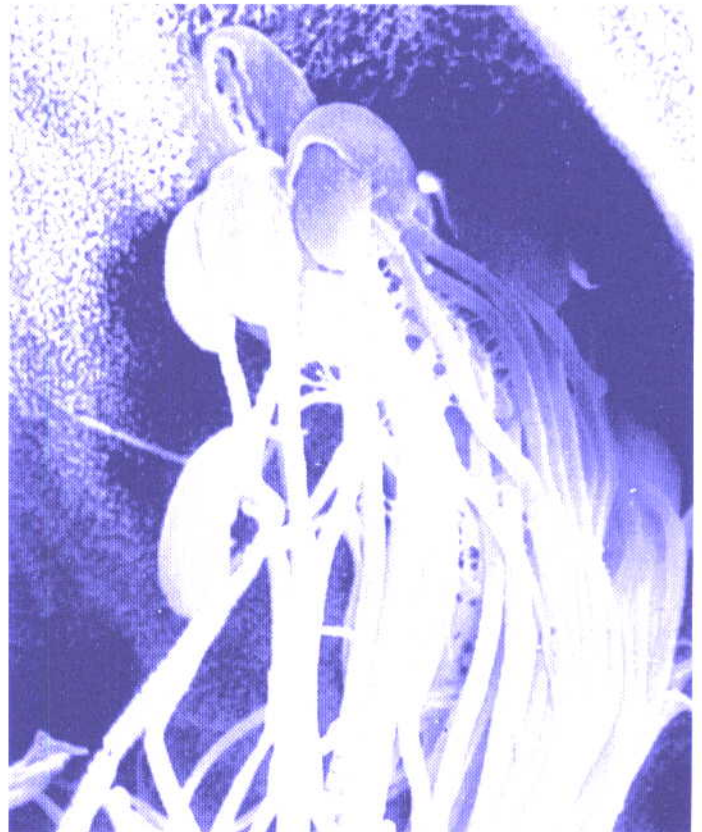
transfections. Employing molecular and immunological techniques, we noticed that about 60% of the in vivo treated spermatozoa integrated the genetic construction. Furthermore, numerous epithelial cells of those bordering the male tract, are capable to integrate and express the foreign genes. This was particularly visible when the GFP (Green Fluorescent Protein) gene was employed, because the transformed cells express the gene as a dazzling cytoplasmic fluorescence. This last topic, could be used in the future in order to manipulate the spermatozoon fertilizing capacity and to regulate the fertilization mechanism.

Figura: Microscopía electrónica de barrido, en la que se aprecia parte de una cripta del istmo del oviducto de una hembra de ratón. Esta hembra fue sacrificada 2 horas después de la cópula, y los escasos espermatozoides que en ese momento han invadido el istmo oviductal, aparecen relativamente ordenados y con su acrosoma intacto. En la fotografía se puede observar además, que la superficie de la cripta presenta numerosas microvellosidades.

Aumento \times : 11.500.

Figure: Scanning electron microscopy of a oviductal isthmus crypt from a female mouse killed 2 hours after coitus. A bundle of spermatozoa which exhibit intact acrosomes, appear attached to the crypt surface. The surface of the crypt display abundant and delicate microvilli.

\times : 11.500.



Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB93-0117. (1994-1997).
- CEE, CII-CT92-0022. (1993-1996).

Tesis de Licenciatura/Master Thesis

- Autor: Eva Huguet Gutierrez. Nuevos métodos para la introducción de genes en espermatozoides de mamíferos. Universidad de Alcalá de Henares, 1995. Director: Pedro Esponda.

Publicaciones/Publications

- Carballada, R., Bustos-Obregón, E., and Esponda, P. (1995). Photoperiod-induced changes in the proteins secreted by the male genital tract of the rodent *Octodon degus*. *J. Exp. Zool.* 272, 384-394.
- Rifo, M., and Parraga, M. (1995). Lysophosphatidylcholine treatment allows interspecies fertilization of hamster oocytes with zona pellucida by human spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 271, 151-154.
- Rojas, M., Morales, B., and Esponda, P. (1995). Effects of photoperiod on structure of lamina propria of the testis of *Octodon degus*. *J. Morphol.* 226, 331-338.
- Cuadros-Fernández, J., and Esponda, P. (1996). Immunocytochemical localisation of the nucleolar protein fibrillarin and of RNA polymerase I during mouse early embryogenesis. *Zygote* 4, 49-58
- Esponda, P., and Gómez Lahoz, E. (1995). Animales transgénicos. En *Seminarios en Citogenética*, J. Gozávez y C. García de la Vega, Eds. (Madrid: Ediciones Universidad Autónoma de Madrid), pp. 141-155.
- Rifo, M.S., and Parraga, M. (1996). Study of the acrosome reaction and the fertilizing ability of hamster epididymal cauda spermatozoa treated with antibodies against phospholipase A2 and/or lysophosphatidylcholine. *J. Exp. Zool.* 275, 459-468.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Carballada, R., and Esponda, P. (1996). Fate and distribution of seminal plasma proteins in the rat female genital tract after natural mating. *J. Reprod. Fertility* (en prensa, 1997).
- Esponda, P., and Huguet, E. (1996). Foreign gene injection into the male genital tract induce genetic modification in spermatozoa. En *Perspectives in Biology and Pathology of Male Reproduction*, F. Martínez García and J. Regadera, eds. (London: Churchill Livingstone) (en prensa, 1997).

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*

CRISTINA ALARCÓN

JOSÉ G. PICHEL (DESDE VIII-1996)

Investigadores Asociados/*Associate Researchers*

BEGOÑA DÍAZ

AIXA V. MORALES

BELÉN PIMENTEL

JOSÉ SERNA

B. Predoctorales/*Graduate Students*

ELENA MARTÍNEZ (HASTA IX-1996)

VIRGINIA QUESADA (DESDE X-1996)

Personal Técnico/*Technical Staff*

Palabras clave: Expresión génica, desarrollo, apoptosis, proinsulina, receptores IGF.

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

El desarrollo desde el huevo fertilizado hasta el organismo maduro ocurre mediante múltiples procesos celulares controlados por moléculas señalizadoras. Estas moléculas actúan sobre células que progresivamente adquieren competencia y expresión génica diferenciales. Nosotros estudiamos un grupo de dichas señales, los factores de la familia de la insulina, que incluyen a ésta, a su precursor la proinsulina y a los factores de crecimiento insulina-*like* (IGFs). Pretendemos caracterizar, a niveles molecular, celular y del organismo, su papel en el desarrollo embrionario.

Keywords: Gene expression, development, apoptosis, proinsulin, IGF receptors.

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

Development from the fertilized egg to the mature organism occurs through multiple cellular processes regulated by signaling molecules. These molecules act on cells that progressively acquire differential competence and gene expression profiles. We study a group of these signals, the factors of the insulin family, that includes insulin, its precursor proinsulin and the insulin-like growth factors (IGFs). We are interested in their role in embryonic development at the molecular, cellular and whole organism levels.

Expresión y acción autocrina/paracrina sobre supervivencia celular de la insulina prepancreática

Los genes de la (pro)insulina y del IGF-I están expresados de forma diferencial durante la gastrulación, neurulación y comienzo de la organogénesis del embrión de pollo. La expresión en múltiples áreas del embrión de (pro)insulina, que precede a la expresión de IGF-I y coincide con expresión ubicua del receptor de insulina, sugeriría una función muy generalizada. Utilizando cultivos de embrión completo en neurulación, hemos demostrado que el mRNA de (pro)insulina se traduce a una proteína secretada, reconocida por anticuerpos anti-insulina. Su síntesis se inhibe por oligonucleótidos complementarios al mRNA de (pro)insulina y esta inhibición induce un aumento de muerte celular por apoptosis en el embrión, reversible por adición de insulina exógena. Con enfoque similar *in vivo*, hemos demostrado que la acción autocrina/paracrina de esta insulina (o proinsulina), expresada durante la neurulación, implica al receptor de insulina. Asimismo, estamos caracterizando la participación del sistema de proteasas de la familia de las caspasas (*ICE-like proteasas*) en la ejecución de la apoptosis temprana y cómo afecta ésta a algunos marcadores de precursores celulares. Tras clonar el cDNA de proinsulina de pollo, hemos generado anticuerpos específicos de proinsulina para analizar el procesamiento de la proinsulina no pancreática y su regulación temporal.

Caracterización de la neurogénesis retiniana, de los efectos de factores de crecimiento y de sus receptores

En el modelo de retina de pollo 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. Los procesos de proliferación y diferenciación neurales son estimulados por insulina, proinsulina e IGF-I actuando de manera autocrina/paracrina. Dado que estos procesos son mutuamente excluyentes, pero ocurren de forma consecutiva, estamos estudiando si la acción primaria subyacente es la regulación de la apoptosis celular.

Los receptores que median los efectos de los factores de la familia de la insulina están poco regulados a nivel transcripcional durante la neurogénesis y diferenciación de la retina,

Expression and autocrine/paracrine action of prepancreatic insulin on cell survival

*(Pro)insulin and IGF-I genes are differentially expressed during gastrulation, neurulation and the beginning of organogenesis in the chick embryo. The expression of (pro)insulin in multiple areas, preceding IGF-I expression and coincident with an ubiquitous expression of insulin receptor, suggested that it has a quite generalized function. Using whole embryo cultures during neurulation we have shown that this (pro)insulin mRNA is translated to a secreted protein immunoprecipitated by anti-insulin antibodies. Its synthesis is inhibited by oligonucleotides complementary to the (pro)insulin mRNA and this inhibition induces an increase of apoptotic cell death, reversible by the addition of exogenous insulin. With a similar approach *in vivo*, we have demonstrated that the action of this autocrine/paracrine insulin (or proinsulin) expressed during neurulation is mediated through the insulin receptor. We are also characterizing the implication of proteases of the caspase family (*ICE-like proteases*) in the execution of this early apoptosis and whether cell precursor markers are affected. After cloning the chicken proinsulin cDNA, the recombinant proinsulin has been used to generate specific antibodies to analyze the processing of the nonpancreatic proinsulin and its temporal regulation.*

Characterization of retinal neurogenesis, effects of growth factors and their receptors

In the chick retina model we are analyzing the biological process that generates, from pluripotent neural precursors, the different neuronal and glial types, constituents of the central nervous system. The processes of neural proliferation and differentiation are stimulated by insulin, proinsulin and IGF-I acting in autocrine/paracrine manner. Since these processes are mutually exclusive and occur consecutively, we are studying whether the underlying primary effect of these factors is the regulation of apoptosis.

The receptors that mediate the action of the insulin family of factors are little regulated at the transcriptional level during retinal neurogenesis and differentiation, but highly regulated at post-transcriptional levels. We have identified during the proliferative phase an atypical receptor with high affinity and low discrimination that binds similarly insulin and IGF-I. This receptor disappears later, during neuroretina differentiation.

pero altamente regulados postranscripcionalmente. Durante la fase proliferativa hemos identificado un receptor atípico de alta afinidad y baja discriminación, que reconoce de forma similar la insulina y el IGF-I y que desaparece durante la fase de diferenciación neural.

Redes de citoquinas en el desarrollo y la regeneración neural

La disponibilidad de ratones mutantes carentes de IGF-I y otras citoquinas neuropoiéticas, como LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) permite actualmente estudiar las posibles interacciones de estos factores dentro de redes y cascadas señaladoras. Hemos analizado la expresión de IGF-I en el ratón carente de LIF tras la lesión de nervio periférico y hallado cooperación de estos factores en la regeneración neural. Estamos iniciando la generación de ratones doble mutantes nulos para IGF-I y LIF que permitirán estudiar esta posible cooperación *in vivo*.

Cytokine networks during development and neural regeneration

The availability of mutant mice lacking IGF-I and other neuropoietic cytokines such as LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) permits now to study the possible interactions of these factors within signaling networks and cascades. We have analyzed the expression of IGF-I in the LIF knockout mice after peripheral nerve lesion and found cooperation of these factors in neural regeneration. We are beginning to generate mice double null mutants for IGF-I and LIF that will allow the study of this possible cooperation *in vivo*.

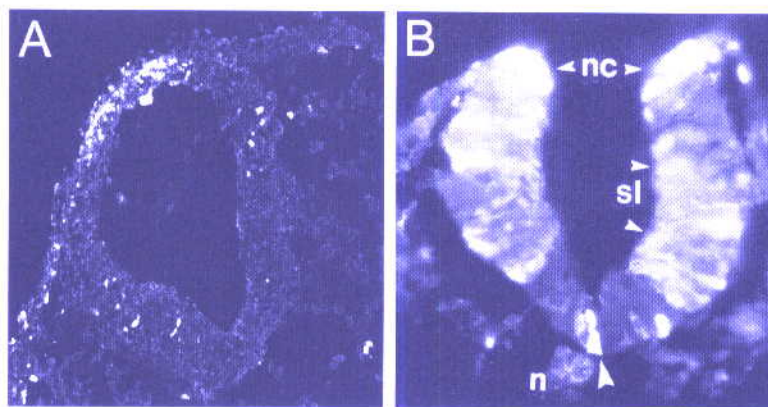


Figura: Secciones de embrión de pollo (~ 36 horas de desarrollo) teñidas para mostrar: A) Apoptosis en la región dorsal del romboencéfalo, revelada por TUNEL, tras la privación de factores de crecimiento en cultivo. B) Epitopo PM-1 (marcador de precursores), abundante en crestas neurales (nc) y algunas células de la placa del piso (flecha) adyacentes a la notocorda (n).

Figure: Chick embryo (~ 36 hours of development) sections stained to show: A) Apoptosis in dorsal rhombencephalon, revealed by TUNEL, after growth factors deprivation in culture. B) PM-1 (precursor marker) epitope, abundant in neural crests (nc) and a few cells of the floor plate (arrow) near the notochord (n).

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PM 94-152. (1995-1998).
- FIS, 94/151. (1994-1996).
- CAM, AE0376/95. (1995).
- NATO, CRG 955792. (1996-1997).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- Ana López Carranza. Expresión y efectos de factores de crecimiento durante el desarrollo de la retina. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Directores: Enrique J. de la Rosa y Flora de Pablo.

Publicaciones/*Publications*

- De Pablo, F., and De la Rosa, E.J. (1995). The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends Neurosci.* *18*, 143-150.
- Hernández-Sánchez, C., López-Carranza, A., Alarcón, C., De la Rosa, E.J.*, and De Pablo, F.* (1995). Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: Local expression and effects on cell proliferation and differentiation in the chicken retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 9834-9838. (* equal contributors).
- Prada, F., Dorado, M., Quesada, A., Prada, C., Schwarz, U., and De la Rosa, E. J. (1995). Developmental expression in the chick embryo of 3CB2, a novel radial-glia antigen. *Glia* *15*, 389-400.
- Morales, A.V., De la Rosa, E.J., and De Pablo, F. (1996). Expression of the cCdx-B homeobox gene in chick embryo suggests its participation in rostrocaudal axial patterning. *Dev. Dynam.* *206*, 343-353.
- Morales, G., Sánchez-Puelles, J. M., Schwarz, U., and De la Rosa, E. J. (1996). Synergistic neurite-outgrowth promoting activity of two related axonal proteins, Bravo/Nr-CAM and G4/Ng-CAM in chicken retinal explants. *Eur. J. Neurosc.* *8*, 1098-1105.
- Pimentel, B., De la Rosa, E.J., and De Pablo, F. (1996). Insulin acts as an embryonic growth factor for *Drosophila* neural cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *226*, 855-861.
- Serna, J., González-Guerrero, P., Scanes, C.G., Prati, M., Morreale, G., and De Pablo, F. (1996). Differential and tissue-specific regulation of (pro)insulin and IGF-I mRNAs and levels of thyroid hormones in growth-retarded embryos. *Growth Reg.* *6*, 73-82.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- De la Rosa, E.J., Díaz, B., and De Pablo, F. Organoculture of the chick embryonic neuroretina. In *Cellular and Molecular Procedures in Developmental Biology*, F. De Pablo, A. Ferrús, C. D. Stern, eds (San Diego, USA: Academic Press). (En prensa, 1997).
- Morales, A.V. and De Pablo, F. Inhibition of gene expression by antisense oligonucleotides in chick embryo in vitro and *in vivo*. In *Cellular and Molecular Procedures in Developmental Biology*, F. De Pablo, A. Ferrús, C. D. Stern, eds (San Diego, USA: Academic Press). (En prensa, 1997).
- Serna, J., Pimentel, B., and De la Rosa, E. J. Flow cytometric analysis of whole organs and embryos. In *Cellular and Molecular Procedures in Developmental Biology*, F. De Pablo, A. Ferrús, C. D. Stern, eds (San Diego, USA: Academic Press). (En prensa, 1997).

Artículos de Divulgación/*Press Articles*

- Ferrús, A., and De Pablo, F. (1995) El sistema nervioso: instrucciones genéticas y desarrollo. *Fronteras de la Ciencia y Tecnología*, *10*, 51-54.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE PLANTAS
DEPARTMENT OF PLANT BIOLOGY

Jefe de Departamento
Department Head

PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ

Profesores de Investigación

PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ
JOSÉ RAMÓN DÍAZ RUIZ
DIONISIO LÓPEZ ABELLA

Investigadores Científicos

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

Colaboradores Científicos

ISABEL GARCÍA LUQUE
FCO. JAVIER MEDINA DÍAZ
SUSANA MORENO DÍAZ DE LA ESPINA
ELÍAS MANUEL ROBLES CHILLIDA
M^a TERESA SERRA YOLDI

Secretaria

M^a VICTORIA LAPITA TOGORES

Biología Celular y Molecular Vegetal

Plant Cell and Molecular Biology

M^a ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ GÓMEZ
Jefe Laboratorio/*Laboratory Head*
Investigadora/*Senior Investigator*

Grupo/Group 1:

SUSANA MORENO DÍAZ DE LA ESPINA
Jefe de Grupo/*Group leader*
Investigadora/*Senior Investigator*

OLGA BASSY ALVAREZ (DESDE VII-1995)
M^a ASUNCIÓN MEDINA DÍAZ (HASTA V-1995)
ANA MÍNGUEZ GARRIDO (HASTA V-1995)
WENDOU YU (DESDE X-1996)
B. Predoctorales/*Graduate Students*

Grupo/Group 2:

FRANCISCO JAVIER MEDINA DÍAZ
Jefe de Grupo/*Group leader*
Investigador/*Senior Investigator*

GUILLERMO DE CÁRCER DÍEZ
FRANCISCA LERÍA MOSQUERA (DESDE IV-1996)
B. Predoctorales/*Graduate Students*

Grupos/Groups: 1, 2

NIEVES FONTÚRBEL CABAÑAS
MERCEDES CARNOTA ROMERO
Personal Técnico/*Technical Staff*

Grupo 1: Matriz Nuclear

Microarquitectura del nucleoesqueleto y actividades asociadas

Palabras clave: Nucleoesqueleto, filamentos, factorías-transcripción, *splicing*.

La matriz nuclear (MN) define al conjunto de las fibras altamente insolubles del nucleoesqueleto y los complejos multiméricos asociados a él, proporcionando el soporte físico para el anclaje de los dominios de cromatina que regulan la expresión coordinada de grupos de genes y los complejos de replicación, transcripción y *splicing* del RNA. En células vegetales, las matrices nucleares muestran una mayor estabilidad que en células animales. Ni la digestión con RNasa, alta fuerza iónica y condiciones reductoras, ni la extracción en bajas concentraciones de urea o con LIS solubilizan los componentes de la matriz interna (MI), sugiriendo una organización diferente del nucleoesqueleto de plantas. La MI de plantas presenta una organización estructural muy constante con dos dominios bien definidos en MET: una malla fibrilar de 10 nm que contiene antígenos de tipo FI y otro fibrillogranular que contiene epítomos de los snRNPs y los gránulos intercromáticos. Aunque las dificultades de fraccionamiento impiden un análisis bioquímico de sus componentes, mediante inmunolocalización, se han detectado en la MI algunos componentes de los complejos de anclaje del DNA, transcripción y

Group 1: Nuclear matrix

The microarchitecture of the nucleoskeleton and attached activities

Keywords: Nucleoskeleton, filaments, transcription factories, *splicing*.

The nuclear matrix (NM) defines the highly insoluble fibres of the nucleoskeleton and the attached multimeric complexes, providing physical support for the anchorage of the chromatin domains that regulate the coordinated expression of genes, and also for the replication, transcription and *splicing* complexes. In plant cells, the nuclear matrices show a higher stability than in animal cells. Neither RNase digestion combined with high salt extraction and reducing conditions, nor 4M urea or LIS extraction solubilize the internal elements of the matrices, suggesting a different organization of the plant nucleoskeleton. The internal matrices of plants present a very constant organization with two structural domains well-defined at the TEM: a network of 10 nm filaments containing antigens related to intermediate filaments (IF) and another fibrogranular with epitopes of snRNP complexes and interchromatin granules. Although the difficulties in fractionating the internal matrix do not allow a biochemical analysis, some components of the transcription and *splicing* complexes have been detected by immunolabelling, suggesting that the nucleoskeleton could provide structural support for them as in animal cells. The nature of the skeletal structures providing

splicing. La naturaleza del sistema esquelético que los soporta es desconocida. En células animales, NuMA, una proteína relacionada estructuralmente con los FI, constituye un componente de los filamentos del nucleoesqueleto interno y sirve de puente entre el nucleoesqueleto y la maquinaria de procesamiento del RNA. En plantas, la detección de antígenos de tipo FI distintos de las laminas intranucleares en los filamentos de la MI, y su gran estabilidad tras extracción en alta fuerza iónica y bajas concentraciones de urea, sugieren que proteínas relacionadas con los FI, podrían constituir una parte del nucleoesqueleto, al cual se asociarían por diferentes mecanismos, no sólo los *loops* de DNA sino también las maquinarias de replicación, transcripción y procesamiento. Estamos trabajando actualmente en:

1.- **La caracterización ultraestructural e inmunológica de los filamentos del nucleoesqueleto en plantas**, mediante microscopía confocal y ME en cortes sin resina que permite la visualización de la red del nucleoesqueleto con alto contraste en tres dimensiones, y la detección inmunocitoquímica simultánea de los epitopos de los filamentos con oro coloidal. El análisis de sus componentes proteicos y RNAs se realiza por métodos bioquímicos.

2.- **Localización y caracterización de las factorías de transcripción y *splicing* asociadas al nucleoesqueleto**, mediante análisis inmunológico con anticuerpos contra diversos componentes de los complejos de transcripción y *splicing* (pol II, factores de transcripción, proteínas de los snRNAs, etc), hibridación *in situ* con sondas de los Usn RNAs y oligo dT así como valoración *in situ* de las actividades correspondientes, mediante incorporación de Br UTP y detección con anticuerpos anti Br UTP marcados con fluorescencia u oro coloidal, y ME de cortes sin resina o microscopía confocal.

Caracterización de las secuencias de anclaje (MARS) de los cistrones ribosómicos a la matriz nucleolar

Palabras clave: MARS, genes ribosómicos, matriz nuclear, proteínas asociadas.

El primer nivel de regulación de la actividad transcripcional de los genes ribosómicos implica la formación de complejos estables entre diferentes proteínas DNA-binding y las

this support is uncertain. In animal cells, NuMA, a protein structurally related with the IFs is a component of the internal nucleoskeleton and provides a bridge between the nucleoskeleton and the processing machinery of RNA. In plants, the detection of IF type epitopes, different from intranuclear lamins, on the filaments of the internal matrix and the resistance of this structure to high and low salt extraction suggest that IF-related proteins could be a part of the nucleoskeleton to which not only DNA loops but also the replication, transcription and processing machineries would be attached. Our current interest focuses on two subjects:

1.- *The ultrastructural and immunocytochemical characterization of the nucleoskeletal filaments in plants by confocal microscopy and resinless EM that allows the visualization of the three-dimensional network in combination with the immunogold detection of their components. Their protein and RNA components are studied by biochemical analysis*

2.- *The localization and characterization of the transcription and splicing factories attached to the nucleoskeleton, by immunological analysis using antibodies against various proteins present in the nucleoskeleton, or in transcription and splicing complexes, as well as the localization of the corresponding activities in situ evaluated by the rate of incorporation of Br-UTP and detected by anti BR UTP antibodies tagged with FITC or colloidal gold. The components of the complexes are identified immunologically with the corresponding antibodies (pol II, transcription factors, proteins of the snRNP, or by in situ hybridization with probes for the Usn RNAs and oligo dT by confocal microscopy or resinless electron microscopy.*

Characterization of the anchoring sequences (MARS) of the ribosomal cistrons in the nucleolar matrix

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

The first level of regulation of the transcriptional activity of ribosomal genes involves the formation of stable complexes between different DNA-binding proteins and the regulatory sequences of the genes, localized in the external transcribed spacers (ETS) and the intergenic non-transcribed spacer (NTS). At this level the number of genes that are potentially active in the cell is determined. In plant cells, only a minimal fraction of the thou-

secuencias reguladoras de los genes localizadas en los espaciadores transcritos externos (ETS) y el espaciador no transcrito (NTS). Así queda determinado el número de genes que son potencialmente activos en la célula. En células vegetales sólo una mínima fracción de los miles de copias de rDNA está activa en células somáticas, y son muy abundantes los ejemplos de dominancia nucleolar en que *locus* completos de genes ribosómicos permanecen inactivos en la célula, mientras una pequeña fracción del rDNA es activa.

Las secuencias MAR constituyen secuencias específicas de DNA, altamente conservadas, responsables del anclaje de los dominios de cromatina a la MN. La unión de las MARs a la MN es saturable y reversible y se efectúa a través de proteínas que se denominan *MAR-binding*. La información sobre secuencias MAR de genes ribosómicos es muy escasa. Los pocos estudios, todos realizados en células animales las han localizado en los espaciadores intergénicos no transcritos (NTS) o en el espaciador transcrito externo (ETS), pero no se conocen ni las secuencias ni las proteínas de la MN implicadas en el anclaje, si bien recientemente se ha demostrado que la nucleolina tiene actividad *MAR binding*. Aunque no existen estudios sobre las MARs de genes ribosómicos de plantas, en guisante se han localizado en el NTS secuencias homólogas a las secuencias de replicación autónoma de levaduras (ARS), que son zonas de asociación a MN, y próximas a ella los orígenes de replicación (*ori*) que son supuestamente regiones MAR estables. Además nosotros hemos detectado una fracción insoluble de nucleolina en la matriz nucleolar de *A. cepa*, y tenemos evidencias preliminares de la presencia de topoisomerasa II, ambas proteínas con actividad *MAR-binding*. Estamos trabajando actualmente en la clonación de los genes ribosómicos de *Allium cepa* para subclonar e identificar las secuencias MAR endógenas en las fracciones de matrices nucleolares, mapear su posición en el IGS, estudiar la afinidad y especificidad de su asociación con las matrices mediante ensayos de asociación *in situ*, e identificar las proteínas de la matriz nucleolar con capacidad *MAR binding* mediante ensayos de *DNA-binding* con las sondas en *blots* de proteínas transferidas e identificación de las proteínas en *western blots* con anticuerpos específicos.

sands of rDNA copies is active in somatic cells and the nucleolar dominance in which complete loci of ribosomal genes remain inactive in the cell while at the same time a small fraction of rDNA is active, is very common.

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

We are now cloning the ribosomal genes of Allium cepa in order to subclone their MARs map their position in the IGS, identify the endogenous MAR sequences in the nuclear matrices and analyze the affinity and specificity of their association to the matrix by in vitro association essays, and identify the proteins of the matrix with MAR-binding activity.

Group 2: Nucleolus

Nucleolar proteins and Cell Proliferation

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

Ribosomes are produced in the cell by a complex process which requires the concerted action of many factors regulating the rate of expression of rRNA genes, and co-ordinating the successive steps of pre-rRNA processing and preribosome assembly. Some of these factors are nonribosomal nucleolar proteins, whose activity is controlled by regulatory mechanisms of cell cycle and proliferation, in such a way that the rate of ribosome biogenesis correlates with the rate of cell proliferation. The characterisation

Grupo 2: Nucleolo

Proteínas nucleolares y proliferación celular

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

Los ribosomas se forman en la célula mediante un complejo proceso que requiere la acción concertada de muchos factores para regular la tasa de expresión de los genes del rRNA y la coordinación de los sucesivos pasos en el procesamiento del pre-rRNA y en el ensamblaje de las partículas pre-ribosómicas. Algunos de estos factores son proteínas nucleolares no ribosómicas, cuya actividad está controlada a su vez por mecanismos reguladores del ciclo y la proliferación celular, de modo que la tasa de formación de ribosomas se correlaciona con el grado de proliferación de la célula. La caracterización de estas proteínas en células vegetales y el estudio de su funcionalidad en las fases del ciclo celular y de su interacción con factores reguladores del estado proliferativo de la célula son los objetivos de esta línea de trabajo. Los primeros resultados se obtuvieron de proteínas previamente descritas en mamíferos (fibrillarina y nucleolina), de las que demostramos su conservación en células vegetales, su distribución estructural en el nucleolo en relación con su papel funcional, la evolución de su expresión durante el ciclo celular y su asociación con el pre-rRNA durante la mitosis y la nucleogénesis. Posteriormente, hemos caracterizado una nueva fosfoproteína nucleolar en cebolla, NopA64, presente en la fracción ribonucleoproteica y en la matriz nuclear, cuyos niveles de expresión y de fosforilación por cdc2 quinasa y caseína quinasa II, así como su distribución subnucleolar son muy distintos en células proliferantes y quiescentes. NopA64 muestra homología con un fragmento de la nucleolina de mamíferos y con sus proteínas homólogas de levaduras. El método utilizado en la identificación de NopA64 nos está permitiendo caracterizar nuevas proteínas nucleolares específicas de células proliferantes de plantas.

Técnicas citológicas estimuladas por microondas

Palabras clave: Microscopía, microondas, Ag-NOR.

La irradiación con microondas estimula considerablemente la reactividad de las sustancias utilizadas en la preparación del material biológico para su observación microscópica. Hemos

of these proteins in plant cells, and the study of their functionality in cell cycle phases, and of their interaction with factors controlling the cell proliferation state, are the goals of this research line. Initial results were obtained from proteins previously described in mammals (fibrillarlin and nucleolin). We demonstrated the conservation of these proteins in plant cells, and described their structural distribution in the nucleolus in relation to their functional role, the evolution of their expression throughout the cell cycle, and their association with pre-rRNA during mitosis and nucleologogenesis. Furthermore, we have characterised a new onion nucleolar phosphoprotein, NopA64, which is present in the ribonucleoprotein fraction and in the nuclear matrix. We have found significant differences between proliferating and quiescent cells with respect to the expression of NopA64, as well as to its phosphorylation by cdc2 kinase and casein kinase II, and to its subnucleolar distribution. NopA64 shows homology with a fragment of mammalian nucleolin and with yeast nucleolin homologues. The method used for the identification of NopA64 is now allowing us to characterise new nucleolar proteins which are specific for proliferating plant cells.

Microwave-enhanced cytological techniques

Key words: Microscopy, microwave, Ag-NOR.

Microwave irradiation enhances the reactivity of substances used in the preparation of biological samples for microscopic observation. We have obtained striking results with the silver staining technique for proteins of the nucleolar organiser (Ag-NOR staining), a technique widely used as a cell proliferation marker, and commonly applied in tumour diagnosis and prognosis. We have achieved a high specificity and reproducibility with a drastic reduction of the staining time. This effect of microwaves is independent of the heat generation. Our present work in this line is concerned with the extension of this specific effect of microwaves to other microscopy-preparative techniques, especially to fixation, in relation to immunoreactivity of cellular components. This project is being carried out in collaboration with Drs. Roberto Marco (Dpt. Bioquímica, UAM) and Carlos Martín Pascual (Distcom Antenas Company, Madrid).

obtenido resultados espectaculares en la tinción con plata de proteomas del organizador nucleolar (tinción Ag-NOR), una técnica ampliamente utilizada como marcador de proliferación celular y aplicada en la diagnosis y prognosis de tumores, consiguiendo una alta especificidad y reproducibilidad con una drástica reducción del tiempo de tinción. Este efecto de las microondas es independiente de la generación de calor. Nuestro trabajo actual en esta línea se centra en extender este efecto específico a otras técnicas preparativas para microscopía, fundamentalmente a la fijación, en relación con la inmunoreactividad de los componentes celulares. Este proyecto se realiza en colaboración con los Dres. Roberto Marco (Dpto. de Bioquímica, UAM) y Carlos Martín Pacual (Empresa Distecom Antenas, Madrid).

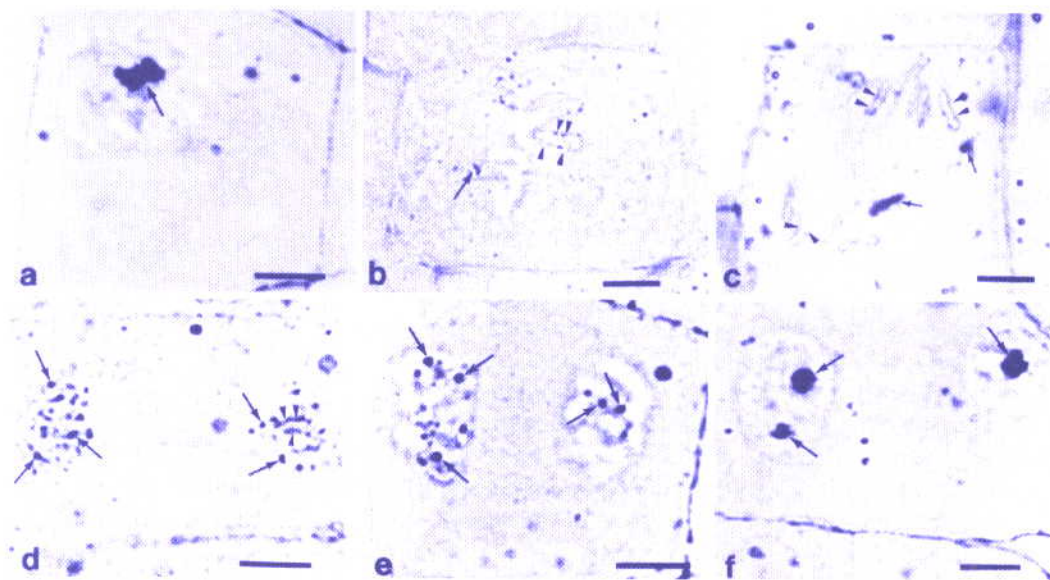


Figura: Mitosis en células meristemáticas de cebolla, observada al microscopio óptico después de tinción de proteínas nucleolares con la técnica Ag-NOR, estimulada por microondas (Medina *et al.*, 1995, *Histochemistry* 103, 403). a: profase; b: metafase; c: anafase; d: telofase temprana; e: telofase; f: células hijas. La técnica de tinción permite observar la evolución del material nucleolar desde su dispersión en profase hasta su reorganización en telofase. En metafase y anafase, además de la región organizadora nucleolar de los cromosomas (flechas en b y c) se aprecia una cubierta pericromosómica que contiene proteínas nucleolares (cabezas de flecha en b y c). En telofase temprana, este material pericromosómico se condensa (cabezas de flecha en d), dando lugar a los cuerpos prenucleolares (flechas en d y e), que funden en el organizador nucleolar para reconstruir los nucleolos de las células hijas (flechas en f). Tanto en la cubierta pericromosómica como en los cuerpos prenucleolares se localiza pre-rRNA por hibridación *in situ*, así como las proteínas nucleolares fibrilarina y nucleolina, que intervienen en el procesamiento del precursor ribosómico (Medina *et al.*, 1995, *Exp. Cell Res.* 221, 111), lo que sugiere que el complejo ribonucleoproteico de procesamiento del pre-rRNA permanece ensamblado durante la mitosis y se incorpora como tal en la nucleogénesis. La división celular únicamente implica la desactivación y reactivación de este complejo macromolecular.

Figure: Mitosis in onion meristematic cells, observed at the light microscope after nucleolar protein staining with the Ag-NOR technique, enhanced by microwaves (Medina *et al.*, 1995, *Histochemistry* 103, 403). a: prophase; b: metaphase; c: anaphase; d: early telophase; e: telophase; f: daughter cells. The staining technique allows the investigation of the evolution of the nucleolar materials from their dispersion in prophase until their reorganisation in telophase. In metaphase and anaphase, in addition to the chromosomal nucleolar organiser region (arrows in b and c) a perichromosomal sheath containing nucleolar proteins is observed (arrowheads in b and c). In early telophase, this perichromosomal sheath is condensed (arrowheads in d) originating the pre-nucleolar bodies (arrows in d and e), which then fuse in the nucleolar organiser to reconstitute the daughter cell nucleoli (arrows in f). In the perichromosomal sheath, as well as in pre-nucleolar bodies, pre-rRNA was localised by *in situ* hybridisation, as well as the nucleolar proteins fibrillar and nucleolin, which take a part in ribosomal precursor processing (Medina *et al.*, 1995, *Exp. Cell Res.* 221, 111). This suggests that the pre-rRNA processing ribonucleoprotein complex remains assembled during mitosis, and it is incorporated in nucleogenesis as such complex. Cell division should only involve de-activation and re-activation of this macromolecular complex.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

Grupos/*Groups* 1, 2:

- DGICYT, PB910124. (1992-1995).
- DGICYT, PB940018A. (1995-1996).
- DGES, PB950117. (1996-1999).

Grupo/*Group* 1:

- Convenio Cooperación Científica CSIC/JNICT de Portugal. (1995).
- Convenio CSIC/CONACYT de México. (1995-1996).
- Convenio Cooperación Científica Hispano-China. (1996-1998).

Grupo/*Group* 2:

- CAM, CAM-MFB/54 1 A-4-640.(1995-1997).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- Ana Mínguez Garrido. Identificación de los principales componentes del nucleoesqueleto en plantas y eucariotas inferiores. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Directora: Susana Moreno Díaz de la Espina.

Publicaciones/*Publications*

Grupo/*Group* 1:

- Moreno Díaz de la Espina, S., (1995). Nuclear matrix isolated from plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 162B, 75-139.
- Mínguez, A., and Moreno Díaz de la Espina, S. (1996). *In situ* localization of nucleolin in the plant nucleolar matrix. *Exp. Cell Res.* 222, 171-178.
- Moreno Díaz de la Espina, S., and Mínguez, A. (1996). Postmitotic assembly of the nucleolus I. The internal matrix network is a recruitment site for processing nucleolar components in PNBs. *Chromosome R.* 4, 103-110,

Grupo/*Group* 2:

- Cerdido, A. and Medina, F.J. (1995). Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma* 103, 625-634.
- Medina, F.J., Cerdido, A., and Marco, R. (1995). Microwave irradiation improvements in the selective silver staining of the nucleolar organizer (Ag-NOR) technique. *Histochemistry* 103, 403-413.
- Medina, F.J., Cerdido, A., and Fernández-Gómez, M.E. (1995). Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp. Cell Res.* 221, 111-125.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- De Cárcer, G., Cerdido, A., and Medina, F.J. NopA64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin. *Planta* (en prensa, 1997).
- Mínguez, A., Bassy, O., Jiménez-García, L.F., Echeverría, O.M., and Moreno Díaz de la Espina, S. Supramolecular organization of the plant nucleolus. Analysis by high resolution *in situ* hybridization, hypotonic treatment and high salt and nuclease extraction. *Chromosome Res.* (en prensa, 1997).

Entomología. Interacciones Planta-Insecto

Entomology. Plant Insect-Interactions

PEDRO CASTAÑERA DOMÍNGUEZ
Jefe de Grupo/Group Leader

FÉLIX ORTEGO ALONSO
Investigadores/Senior Investigators

VICENTE MARCO MANCEBÓN
B. POSTDOCTORAL/POSTDOCTORAL FELLOW

MAYORAL CANALEJAS, ANA (HASTA VII-1995)
TABERNER PALOP, ANA (1995)
CONCEPCIÓN NOVILLO ALMENDROS (DESDE II-1995)
JESÚS LÓPEZ OLGUÍN (DESDE III-1995)
GEMA PÉREZ FARINÓS (DESDE II-1996)
ISMAEL SÁNCHEZ RAMOS (DESDE III-1996)
B. Predoctorales/Graduate Students

M^a LUISA RUIZ SERRA
Personal Técnico/Technical Staff

Uno de los objetivos es investigar los efectos de varios compuestos aleloquímicos de bajo y alto peso molecular sobre la biología y el comportamiento de varias plagas de importancia económica. Así mismo, estamos estudiando la biología y ecología de un curculiónido que ataca a la remolacha azucarera, y la de los ácaros del jamón. Los trabajos en curso son:

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

Se ha establecido 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*. Se ha analizado el comportamiento de alimentación de *D. noxia*, mediante "Electrical Penetration Graph", en varios genotipos de cereales de invierno, con distintos niveles de DIMBOA, y en cebada que no contiene este compuesto.

Our work is primarily focused on the physiological and behavioural effects that allelochemicals of low and high molecular weight might have on the performance of agricultural insect pests. We are also studying the biology and ecology of a sugar beet weevil and of cured jam mites. Specifically, we are investigating:

Role of hydroxamic acids in cereal resistance against aphid damage

*The relationship between hydroxamic acids (Hx) (DIMBOA and DIBOA) and the intrinsic rate of natural increase (r_m) of the Russian wheat aphid (RWA), *Diuraphis noxia*, on selected genotypes of bread and hard wheats has been studied. The feeding behaviour of *D. noxia* on cereal genotypes with different Hx levels and on barley, which lacks of these compounds, was assessed using the Electrical Penetration Graph technique.*

Potencial de inhibidores de proteasas en el control de plagas

Estamos caracterizando las proteasas presentes en el tubo digestivo de plagas de interés agrícola y su interacción con potenciales proteínas de defensa. Estos conocimientos son necesarios para la obtención de plantas transgénicas. Hemos caracterizado en detalle las enzimas proteolíticas de dos plagas de gran relevancia en España, el taladro del maíz, *Sesamia nonagrioides* y el escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata*, e identificado estas actividades proteolíticas en otras 15 plagas de importancia económica. Actualmente, estamos evaluando los efectos *in vitro* e *in vivo* de inhibidores comerciales de proteasas en las dos especies mencionadas.

Actividad de compuestos de origen botánico sobre plagas agrícolas

Se han aislado varios terpenoides tóxicos y/o deterrentes, procedentes de extractos de frutos de *Trichilia havanensis* (Meliaceae), y de plantas de *Scutellaria alpina* y de *Teucrium* spp (Labiatae). Estamos evaluando la actividad y el modo de acción de varios de estos compuestos, mediante bioensayos de preferencia y no-preferencia e índices nutricionales, contra el escarabajo de la patata y varias especies de noctuidos.

Biología, ecología y control del curculiónido *Aubeonymus marieae-franciscae*

Hemos desarrollado un modelo lineal y otro no lineal (Logan tipo III) para predecir el desarrollo de los estados inmaduros de *A. marieae-franciscae* y poder reducir los tratamientos químicos. Asimismo, estamos evaluando el potencial de control de un regulador del crecimiento (Hexaflumuron), insecticida toxicológicamente más favorable que los en uso (neurotóxicos). Estamos realizando ensayos de campo para conocer la ecología de este curculiónido en zonas remolacheras del sur de España y establecer la relación plaga-daño-pérdidas.

Estrategias para el control de los ácaros del jamón

Hemos determinado dos especies de ácaros, *Tyrophagus putrescentiae* y *Tyrophagus longior* (Acaridae), en los secaderos de jamón muestreados. Se ha puesto a punto un método para estudiar en el laboratorio la biología de ambas especies a distintas temperaturas. Estamos evaluando el potencial de control de varios terpenoides, pertenecientes a plantas de los géneros *Lavandula*, *Mentha* y *Eucaliptus* sobre estas especies de ácaros, al estar prohibido el uso de acaricidas.

Potential of protease inhibitors to control agricultural pests

We are interested in the characterization of digestive proteases from insect pests and their interaction with potential defense proteins. This knowledge is essential to ascertain which protease inhibitors should be selected for the development of transgenic plants. So far, we have thoroughly characterized the proteolytic enzymes of two important pests in Spain, the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides*, and the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and identified the proteolytic activity of another 15 economically important pests. At present, we are testing the *in vitro* and *in vivo* effects of commercial and novel protease inhibitors on the two species mentioned above.

Activity of plant natural products on insect pests

Bioassay-guided fractionation of *Trichilia havanensis* (Meliaceae) fruits, and *Scutellaria alpina* and *Teucrium* spp (Labiatae) plants have led to the isolation of several toxic and/or antifeedant terpenoids. We are testing the activity and mode of action by choice and no-choice bioassays and nutritional tests of these compounds on the Colorado potato beetle and several species of noctuids.

Biology, ecology and control of the sugar beet curculionid, *Aubeonymus marieae-franciscae*

We have established both a linear and a non-linear model (Logan type III), which can be used to predict the development of this species and to reduce the number of chemical treatments. In addition, we have found that the insect growth regulator hexaflumuron is an environmentally friendly alternative to the use of the neurotoxic insecticides, commonly used for the control of this pest. Field studies are in progress to determine the ecology of this curculionid and the pest damage-sugar beet loss relationship in southern Spain.

Control strategies for cured ham mites

Two species of mites, *Tyrophagus putrescentiae* and *Tyrophagus longior* (Acaridae) have been identified in the jam warehouse sampled. We are studying in the laboratory the biology of both species at different temperatures. Evaluation of the toxicity of several terpenoids, isolated from plants of the genus *Lavandula*, *Mentha* and *Eucaliptus* is in progress, since the use of acaricides is banned.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CEE, STD2-642. (1992-1995).
- CICYT, AGF95-0065-CO2-01. Coordinado con AIMCRA. (1995-1997).
- CAM, COR0037/94. Coordinado con la Universidad Politécnica de Madrid. (1995-1997).
- ACOREX. SCL. (1996-1997).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Ana Mayoral Canalejas. Papel de los ácidos hidroxámicos de cereales en el control de *Diuraphis noxia* (Homoptera, Aphididae). Universidad Complutense de Madrid, 1995. Director: P. Castañera Domínguez
- Ana Taberner Palop. Biología y Caracterización Molecular de *Aubeonymus mariaefrancisca* (Coleoptera, Curculionidae), Plaga de la Remolacha Azucarera. Universidad de Valencia, 1995. Director: P. Castañera Domínguez.

Publicaciones/Publications

- González-Coloma, A., Reina, M., Cabrera, R., Castañera, P., and Gutierrez, C. (1995). Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from *Senecio palmensis* to Colorado potato beetle. *J. Chem. Ecology* 21, 1255-1270.
- Ortego, F., Rodríguez, B., and Castañera, P. (1995). Effects of neo-clerodane diterpenes from *Teucrium* on the feeding behavior of Colorado potato beetle larvae. *J. Chem. Ecology* 21, 1375-1386.
- Castañera, P., Steffens, J. C., and Tingey, W. M. (1996). Biological performance of Colorado potato beetle larvae on potato genotypes with differing levels of PPO. *J. Chem. Ecology* 22, 91-101.
- Mayoral, A. M., Tjallingii, W. F., and Castañera, P. (1996). Probing behaviour of *Diuraphis noxia* on five cereal species with different hydroxamic acid levels. *Entomol. Exp. Appl.* 78, 341-348.
- Ortego, F., Novillo, C., and Castañera, P. (1996). Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32, 163-180.
- Marco, V., and Castañera, P. (1997). Eficacia de aplicaciones foliares de insecticidas con torre de Potter sobre adultos de *Aubeonymus mariaefrancisca* (Coleoptera, Curculionidae). *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 22, 659-666.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Taberner A., Dopazo, J. and Castañera, P. Genetic characterization of populations of a *de novo* arisen sugar beet pest *Aubeonymus mariaefrancisca* (Coleoptera, Curculionidae), by RAPD analysis. *J. Mol. Evol.* (en prensa, 1997).
- López-Olguín, J.F., Budia, F., Castañera, P., and Viñuela, E. Actividad de *Trichilia havanensis* (Meliaceae) sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* (en prensa, 1997).
- Marco V., Taberner A., and Castañera, P. Development and survival of immature *Aubeonymus mariaefrancisca* Roudier (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Ann. Entomol. Soc. Am.* (en prensa, 1997).
- Novillo, C., Castañera, P., and Ortego, F. Inhibition of digestive trypsin-like proteases from larvae of several lepidopteran species by the diagnostic cysteine protease inhibitor E-64. *Insect Biochem. Molec. Biol.* (en prensa, 1997).

Organización Nuclear Durante el Desarrollo de Plantas

Nuclear Organization During Plant Development

MARÍA CARMEN RISUEÑO
Jefe de Grupo/*Group Leader*

PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO
Investigadores/*Senior Investigators*

PARICHERER AHMADIAN (1995)
BEGOÑA FADÓN SALAZAR
GUADALUPE PRÉSTAMO MARTÍNEZ (DESDE III-1996)
Investigadores Asociados/*Associate Scientists*

PABLO GONZÁLEZ-MELENDE DE LEÓN
CONCEPCIÓN GÓMEZ MENA (HASTA V-1995)
JESÚS REDONDO DE LA MORENA (DESDE X-1995)
B. Predoctorales/*Graduate Students*

CARLOS ALMARZA SANZ
Personal Técnico/*Technical Staff*

Palabras Clave: Núcleo, nucleolo, microscopía electrónica, embriogénesis del polen, localización *in situ*.

I. Estudio ultraestructural de la organización funcional del núcleo celular mediante el establecimiento de relaciones estructura-función en distintas fases del ciclo celular y durante procesos de desarrollo en plantas. Combinación de métodos de inmunomarcado con oro, para la localización de proteínas (inmunocitoquímica) y secuencias específicas de ácidos nucleicos (hibridación *in situ*), y técnicas citoquímicas compatibles con inmunomarcado para una correcta asignación de las partículas de oro a los distintos compartimentos nucleares. Puesta a punto de técnicas preparativas de muestras a baja temperatura o criométodos con objeto de conseguir una óptima preservación de la ultraestructura y la reactividad antigénica y química. En particular se estudian los cambios dinámicos que tienen lugar en la arquitectura nucleolar en relación a la tasa de síntesis de ribosomas y en la región interchromatinica, así como las subestructuras nucleares implicadas en la síntesis de rRNA y hnRNA mediante métodos ultraestructurales de localizaciones *in situ*, la bromouridina y el inmunomarcado de los híbridos DNA/RNA que hemos puesto a punto para células vegetales.

Keywords: Nucleus, nucleolus, electron microscopy, pollen embryogenesis, *in situ* localizations.

I. *Ultrastructural study of the functional organization of the cell nucleus by structure-function relationships at different phases of the cell cycle and during plant developmental processes. Combination of immunogold methods labelling proteins (immunocytochemistry) and specific sequences of nucleic acids (in situ hybridization) and cytochemical techniques for a correct assignment of labelling to the different nuclear compartments. Developing of cryomethods in order to get an optimum preservation of the antigenic and chemical reactivities. We pay special attention to the dynamic changes occurring in the nucleolar architecture in relation to ribosome biogenesis rate, in the interchromatin region and in the nuclear substructures involved in the rRNA and hnRNA synthesis. Ultrastructural in situ mapping of transcription is performed by bromodeoxyuridine and immunogoldlabelling of DNA/RNA hybrids, previously developed by us for plant cells*

II. *Study of the developmental program of the male gametophyte: We follow the dynamical changes taking place in the chromatin pattern, interchromatin region, and nucleolus at diffe-*

II. Estudio del programa de desarrollo del gametofito masculino. Para ello se siguen los cambios dinámicos que tienen lugar en el patrón de cromatina, región intercromatínica y nucleolo en las distintas fases del ciclo celular, relacionándolos con la diferente actividad génica que tiene lugar durante la maduración *in vivo* de la microspora y el polen bicelular. Se han utilizado anticuerpos que localizan ácidos nucleicos y proteínas asociadas a funciones nucleares tales como replicación, transcripción, maduración del hnRNA, rRNA así como sondas rRNA, snRNA, snoRNA con objeto de definir el estado de actividad del núcleo durante estas fases. Los patrones de distribución en cada etapa del desarrollo gametofítico y específicamente en los núcleos de la microspora y de las células vegetativa y generativa, proporcionarán datos sobre los procesos que tienen lugar en cada momento y los cambios más notables en fases concretas. Este análisis permitirá también determinar marcadores celulares de etapas concretas del desarrollo.

III. Inducción de embriogénesis en cultivos *in vitro* de polen aislado y estudio celular de fases clave durante el proceso de inducción. Estudio de los cambios en la organización funcional del núcleo que acontecen cuando es reprogramado hacia embriogénesis mediante la comparación con el patrón de desarrollo *in vivo*. Este estudio se realiza durante dos estadios cruciales de la embriogénesis: el estadio más susceptible para la inducción, el de microspora vacuolada según estudios previos del grupo en polen de pimiento, y en las primeras fases de la embriogénesis. La localización *in situ* de dianas moleculares que intervienen en el disparo de embriogénesis, tales como una proteína de *heat-shock*, MAPquinasas, implicadas en la transducción de señales de estrés, diferentes ciclinas (PCNA, cdc2, etc.) o reguladores negativos de ciclo como la p21, se realiza mediante hibridación *in situ* e inmunocitoquímica. Hasta ahora no existen datos sobre la localización *in situ* y expresión de estos factores durante diversos momentos del cultivo, lo cual proporcionará información sobre su posible función en el proceso de reprogramación hacia polen embriogénico.

rent phases of the cell cycle in relation to the different gene activity during the process of in vivo maturation of microspore and bicellular pollen. We use antibodies localizing nucleic acids and proteins associated to nuclear functions such as replication, transcription and RNA maturation and probes recognizing rRNA, snoRNA, snRNA as well, in order to define the nuclear activity stage along this phases. The different patterns of distribution in the nucleus of the microspore and generative and vegetative cells provide relevant data on the process taking place in each specific phase as well as relevant changes in precise periods. This analysis also allows the determination of cellular markers at concrete stages of pollen embryogenesis.

III. *Embryogenesis induction of isolated pollen in vitro cultured, and cellular study of key phases during the induction process. Study of the changes taking place in the functional organization of the cell nucleus when pollen is deviated towards embryogenesis by means of the comparison with the pattern of in vivo development. This study is carried out during two crucial steps of the embryogenesis: the most susceptible stage for the induction, the vacuolated stage, as indicated by our previous studies on pollen pepper, and in the early steps of the embryogenesis. The in situ localization of molecular targets, which are involved in the triggering of the embryogenesis induction, such as a specific heat-shock protein, MAP-kinases (MAPK) involved in the stress signal transduction, different cyclines PCNA, cdc2, etc., or negatives regulators as p21, is carried out by immunogoldlabelling and in situ hybridization. Up to now there are no data on the localization and expression of these factors during the different phases of the culture. All this will provide relevant information about their possible functions in the reprogramming process of the pollen to embryogenesis*

Figura 1: Anti-MAPK. Inmunomarcado con oro. Célula meristemática en proliferación de *A. Cepa*. × 60.000.

Figura 2: Hibridación *in situ*. MAPK mRNA. Célula meristemática de raíz quiescente de *A. Cepa*. × 75.000.

Figuras 1 y 2: Fijación con paraformaldehído, deshidratación en metanol con P.L.T. y método MA en bloque (en: Testillano *et al.*, J. Struct. Biol. 114, 123-139) e inclusión en Lowicryl a baja temperatura. CHR, cromatina, IR, región intercromatínica, CT, citoplasma, V, vacuola citoplásmica.

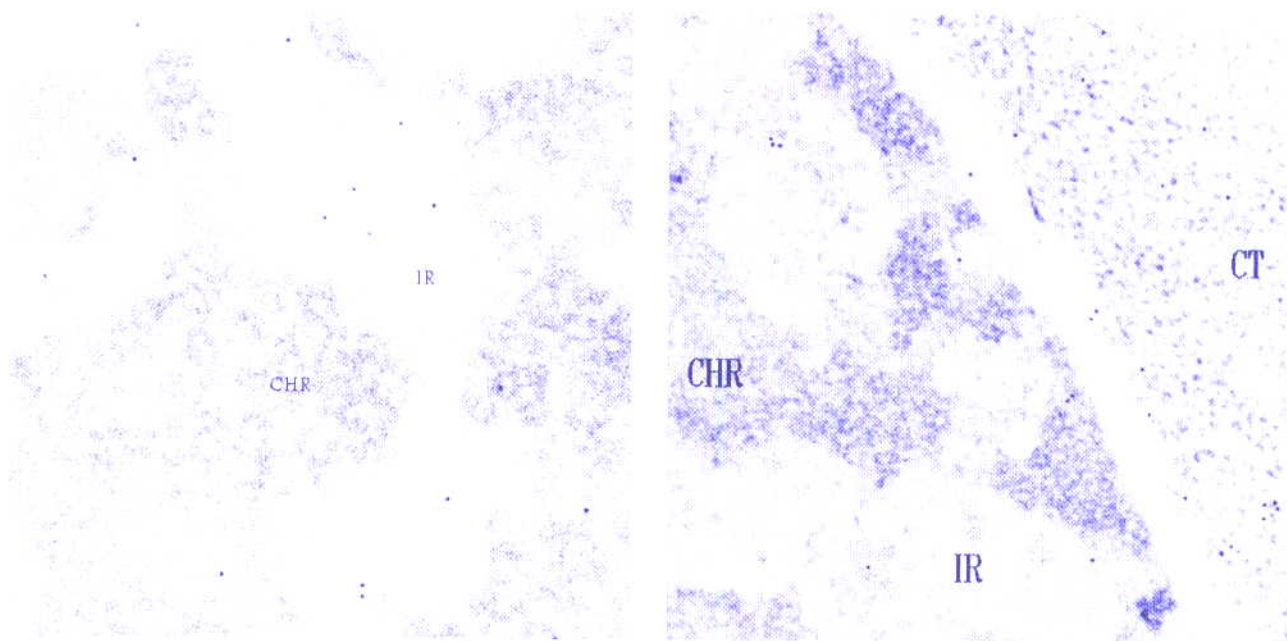


Figure 1: Anti-MAPKase. Immunogold labelling. Proliferating cell from *A. cepa* root meristem. $\times 60,000$.

Figure 2: *In situ* hybridization. MAPKase mRNA. Quiescent cell from *A. cepa* root meristem. $\times 75,000$.

Figures 1 and 2: Paraformaldehyde fixation, methanol dehydration by PL-T and MA method in bloc (Testillano et al., J. Estruct. Biol. 114: 123-139) and Lowicryl embedding at low temperature. CR, chromatin; IR, interchromatin region; CT, cytoplasm; V, cytoplasmic vacuole.

Tesinas de Licenciatura/Master Thesis

— Concepción Gómez Mena. Inmunolocalización de RNA en células meristemáticas de *Allium cepa* L. y granos de polen en desarrollo de *Capsicum annuum* L. Universidad Autónoma de Madrid, 1995. Directora: P.S. Testillano.

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

— Pablo González-Melendi de León. Caracterización *in situ* mediante sondas moleculares del proceso de inducción de embriogénesis del polen en *Capsicum annuum* L. Universidad Complutense de Madrid, 1996. Directora: M.C. Risueño.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB92-0079-C03-01. (1993-1996).
- DGICYT, PB95-0133. (1996-1999).
- CAM, AE00148/95.
- UE, BIO4-CT96-0275. (1996-1999).
- UE, COST action 824. (1995-1998).
- UE, Plant Biotechnology Network. (1995-1998).
- CSIC/Universidad de Viena. (1994-1996).
- CSIC/Academia Húngara de Ciencias. (1994-1996).
- CSIC/Academia Checa de Ciencias. (1991-1996).

Publicaciones/Publications

- González-Melendi, P.; Testillano, P.S., Ahmadian, P., Fadón, B., Vicente, O., Risueño, M.C. (1995). *In situ* characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in *Capsicum*. *Protoplasma* 187, 60-71.
- Raska, I., Dunder, M., Koberna, K., Melcak, I., Risueño, M.C., Török, I. (1995). Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centres or dense fibrillar components?. A critical appraisal. *J. Struct. Biol.* 114, 1-22.
- Testillano, P.S., Fadón, B., Risueño, M.C. (1995). Ultrastructural localization of the polysaccharidic component during the sporoderm ontogeny of the pollen grain of *Scilla peruviana* (Liliaceae) and *Capsicum annuum* (Solanaceae). *Rev. Paleobot. Palynol* 85, 53-62.
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P., Fadón, B., Risueño, M.C. (1995). The immunolocalization of nuclear antigens to study the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. *Exp. Cell Res.* 221, 41-54.
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P., Risueño, M.C. (1995). The methylation-acetylation (MA) method, an ultrastructural cytochemistry for nucleic acids compatible with immunogold studies. *J. Struct. Biol.* 114, 123-139.
- González-Melendi, P., Testillano, P.S., Ahmadian, P., Fadón, B., Risueño, M.C. (1996). New *in situ* approaches to study the induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annuum*. *Eur. J. Cell Biol.* 69, 373-386.
- González-Melendi, P., Testillano, P.S., Préstamo, G., Fadón, B., Risueño, M.C. (1996). Cellular characterization of key developmental stages for pollen embryogenesis induction. *Int. J. Dev. Biol. Suppl* 1, 127S-128S.
- Melcak, I., Risueño, M.C., Raska, I. (1996). Ultrastructural nonisotopic mapping of nucleolar transcription sites in onion protoplasts. *J. Struct. Biol.* 116, 253-263.
- Risueño, M.C., Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P. (1996). Distribution of ribosomal genes and transcripts and involved antigens by *in situ* hybridization in plants at CLSM and EM. In: *The Scandinavian Society for Electron Microscopy*. Maunsbach, A.B. (ed.). Aarhus Universitet. Dinamarca. pp. 42-43. (1996).
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P., Préstamo, G., Mena, C.G., Risueño, M.C. (1996). Dynamics of ribosome biogenesis during the pollen developmental program by *in situ* localization of nucleolar targets. *Int. J. Dev. Biol. Suppl* 1. pp. 121S-122S.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- González-Melendi, P., Testillano, P.S., Ahmadian, P., Risueño, M.C. A correlative study of rDNA organization in plant nucleolus at CLSM and TEM. In: *Electron Microscopy 1996*. (en prensa, 1997).
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P., Risueño, M.C. Dynamics of the functional organization of the plant cell nucleus by EM localization of molecular targets. In: *Electron Microscopy 1996*. (en prensa, 1997).

Quimiorrecepción en Insectos

Chemical Communication in Insects

ELÍAS MANUEL ROBLES CHILLIDA
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador Científico/*Senior Investigator*

Quimiorrecepción en insectos

Equipos receptores en insectos plaga: Ultraestructura, función y relación huésped-parásito

Una vez finalizados los estudios sobre la relación hospedador animal-parásito, que se centraron sobre *Aleurothrixus floccosus* - *Cales noacki*, se están llevando a cabo investigaciones sobre la relación hospedador vegetal-parásito, haciendo especial mención en los insectos plaga *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae) y *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).

En este sentido, se ha puesto de manifiesto la morfología funcional del oviscapto de *Ceratitis capitata*, determinándose la ultraestructura de su aparato ovipositor y de los equipos receptores existentes en el mismo, que sin duda intervienen en la correcta oviposición.

Chemical communication in insects

Receptor systems of insect pests: Ultrastructure, function and host-parasite relation

Once the studies of host animal-parasite relation were finished, which were referred to *Aleurothrixus floccosus* - *Cales noacki* we have carried out several investigations of host-plant parasite relation, paid attention to insect pests *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).

In this way, we have elucidated the functional morphology of ovipositor organ of *Ceratitis capitata*, establishing the ultrastructure of the ovipositor and the receptor systems located in the same, that contribute to the right oviposition, undoubtedly.

Se ha demostrado la existencia de una gran diversidad de formaciones sensitivas a nivel del estilete, agrupándose en siete categorías atendiendo a su localización, estructura y función. Estos receptores responden a estímulos mecánicos o químicos de contacto fundamentalmente, lo que presupone que el oviscapto posee un marcado poder de discriminación frente a una amplia gama de estímulos. Los resultados obtenidos explicarían el comportamiento de la hembra en el momento de la puesta.

Bioquímica, farmacología y toxicología: Morfología funcional

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

Radicales libres de oxígeno implicados en los mecanismos de hepatotoxicidad inducida por xenobióticos, modulación por efecto del envejecimiento

Hemos realizado estudios sobre las variaciones experimentales en los mecanismos generadores de especies activas de oxígeno y en los sistemas de defensa antioxidante, en el proceso de necrosis hepática y regeneración inducida por xenobióticos, a lo largo de la edad.

La sustancia empleada como hepatotóxico fue la tioacetamida (fungicida) en los experimentos *in vivo*, y en los *in vitro*, la cocaína.

Entre otros resultados, destacamos que la cocaína induce la apoptosis.

We have demonstrated the existence of great diversity of sensitive formations over the blade, assembled in seven groups, attending to location, structure and function. These receptor respond to both mechanical and chemical-contact stimuli preferently. This presupposes a marked power of discrimination between a wide class of stimuli. The results could be explain the female behaviour along the oviposition processes.

Oxygen radical frees involved to mechanisms of hepatotoxicity induced to xenobiotics. Modulations by effect of the age.

We have been carried out studies on the variations tested in the mechanisms of active oxygen species generation and the systems of antioxidant defenses, in processes of hepatic necrogenic and induced regeneration by xenobiotic age-dependent.

In the experiments in vivo, the substance used as hepatotoxic was the thioacetamide (fungicide), and in vitro, the cocaine.

Among results, we emphasized that the cocaine induces the apoptotic cell death.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

— FIS, 95-0032-01. (1995-1997).

Publicaciones/*Publications*

— Mayo, I., Malagón, J., Garrido, A., y Robles-Chillida, E.M. (1995). Variaciones morfológicas antenales entre las larvas de primer y último estadio de *Capnodis tenebrionis* (L. 1758) (Coleóptera: *Buprestidae*). *Phytoma* 69, 43-47.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

— Mayo, I., Garrido, A., y Robles-Chillida, E.M. (1996). Estudio ultraestructural de los órganos sensitivos en el oviscapto de *Ceratitis capitata* (Wied.). (Diptera: *Tephritidae*). *Phytoma* (en prensa, 1997).

Virología Molecular de Plantas

Plant Molecular Virology

Grupo/Group 1:

JOSÉ RAMÓN DÍAZ RUÍZ
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

ESTEBAN SAN JOSÉ MÉNDEZ (HASTA X-1995)
FRANCISCO TENLLADO PERALO
B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

JUMANA TRAD YUNES
M. CARMEN LAHOZ BELTRÁ
B. Predoctorales/*Graduate Students*

Grupo/Group 2:

M^a TERESA SERRA YOLDI
Jefe de Grupo/*Group Leader*

ISABEL GARCÍA LUQUE
Investigadoras/*Senior Investigators*

M^a ÁNGELES CEREZUELA ROSIQUE
JOSÉ M^a TOSTADO ÁLVAREZ
Investigadores Asociados/*Associate Researchers*

M^a ISABEL ELVIRA GUJARRO (DESDE I-1996)
B. Postdoctoral/*Postdoctoral Fellow*

BENJAMÍN BERTIALES FRAGA
ALBERTO DE LA CRUZ
PATRICIA GILARDI NAVARRO
LISSETT LÓPEZ MOREJÓN (HASTA XII-1995)
ANA ISABEL SANZ MOLINERO (HASTA III-1996)
B. Predoctorales/*Graduate Students*

Grupo/Group 3:

DIONISIO LÓPEZ ABELLA
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

TOMÁS CANTO CEBALLOS
JUAN JOSÉ LÓPEZ-MOYA
B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

CÉSAR LLAVE CORREAS
BELÉN MARTÍNEZ GARCÍA
B. Predoctorales/*Graduate Students*

Grupos/Groups 1, 2 y 3

EMILIANA LIÉBANA ALLENDE
MONSERRAT LLORENTE DE MINGO
ADELA MARTÍN DE SAAVEDRA (HASTA V-1995)
CARMEN DÍAS-AMADO CAVANILLAS (HASTA X-1996)
Personal Técnico/*Technical Staff*

Grupo 1:

Palabras clave: Virus vegetales, RNAs satélites, RNAs defectivos, resistencia transgénica, control enfermedad.

Nuestro laboratorio mantiene, durante los últimos años, un programa de investigación orientado hacia el control biológico de enfermedades virales en plantas. Recientemente, el énfasis se ha puesto en: 1) la caracterización de nuevos virus emergentes que producen enfermedades de importancia económica para la agricultura española; 2) la determinación de las propiedades moleculares de los virus y el desarrollo de técnicas para su diagnóstico; 3) el estudio de RNAs satélites y RNAs defectivos interferentes de virus de plantas y su función reguladora en la expresión de la enfermedad viral y 4) el análisis de estrategias de resistencia transgénica a virus en plantas, derivada del patógeno, y la elucidación de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la resistencia.

Grupo 2:

El interés de nuestro trabajo se centra en el estudio de la patogénesis de los virus de las plantas, es decir, en conocer por qué en determinadas combinaciones huésped-parásito se 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; y iii) la caracterización de la respuesta del huésped durante la activación de los mecanismos de defensa de la planta.

Hemos determinado mediante la construcción de transcritos virales quiméricos que la proteína de cubierta del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-S) es la responsable de la activación del gen de resistencia L^3 que conlleva la localización de la infección viral y la supresión de la replicación en las plantas de *Capsicum chinense*.

Group 1:

Keywords: Plant viruses, Satellite RNAs, Defective RNAs, transgenic resistance, disease control.

Our laboratory maintain a research program, over the last years, focused toward the biological control of plant virus diseases. Recent emphasis has been on: 1) the characterization of new, emerging viruses producing economically important diseases to the spanish agriculture; 2) the determination of the viruses molecular properties and the development of techniques for their diagnosis; 3) the study of viral satellites and defective interfering RNAs and their regulatory role in viral disease expression and 4) the analysis of pathogen derived, transgenic resistance strategies to viruses in plants and the elucidation of the cellular and molecular mechanisms involved in resistance.

Group 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 are analysing the resistance mechanisms that operate in 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 characterization of the host response during the activation of plant defense mechanism(s).

By constructing chimeric hybrid viruses at the cDNA level, we have identified the viral coat protein of pepper mild mottle virus (PMMoV-S) as the viral elicitor of the L^3 gene-mediated defense reaction that leads to the localization of viral infection as well as to the supression of virus replication.

In the study of the host defense response, we are analysing distinct proteins and mRNAs that are induced upon the activation of the host defense response. It is our purpose to identify the host genes involved in conferring the resistance against pathogens with the aim of using them in plant breeding.

Actualmente estamos caracterizando las proteínas y mRNAs que se inducen en la activación de la respuesta de defensa de *C. chinense* frente a la infección viral con el objetivo de identificar los genes de la planta que están involucrados en la resistencia frente a agentes patógenos y que podrían ser utilizados en programas de mejora genética vegetal.

Grupo 3:

Los potyvirus constituyen uno de los más numerosos e importantes grupos de virus de plantas y afectan a una extensa variedad de cultivos agrícolas de importancia económica. En la naturaleza son transmitidos por áfidos de forma no persistente, lo que significa que los virus se asocian externamente y durante periodos breves de tiempo con lugares específicos en el canal alimenticio del áfido.

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

Una hipótesis sobre la función de estas proteínas en la transmisión es que el HC actúa regulando la interacción entre la partícula viral a través de la CP y el canal alimenticio del áfido.

Actualmente nuestros trabajos se enfocan, principalmente, al conocimiento de los mecanismos de transmisión con los siguientes objetivos:

-Caracterización molecular de la proteína de la cápsida de la partícula viral (CP) y la proteína componente helper (HC) de aislados españoles del virus Y de la patata (PVY) y de la sharka, *plum pox virus* (PPV). Efecto de las posibles mutaciones responsables de las funciones de estas proteínas en el proceso de transmisión.

-Ensayos *in vitro* de interacciones entre el componente *helper* (HC), la cápsida viral (CP) y lugares de retención en el áfido.

-Obtención de plantas con resistencia transgénica mediada por RNA que codifica para el gen no estructural HC.

-Evaluación de métodos de detección y producción de anticuerpos monoclonales de aislados españoles de PPV y PVY HC.

Group 3:

Potyriviruses are among the most numerous and important of plant virus families, with members that infect most economically important crops. Most potyriviruses are naturally transmitted by aphids in a nonpersistent manner. This means that these viruses are externally associated with the cuticular linings of the mouthparts or alimentary tract. The mechanisms that govern the transmission process of potyvirus by aphids are still poorly understood. So far, two virus-encoded proteins are known to be involved in the transmission process: the coat protein (CP) and a nonstructural protein the helper component (HC).

A current hypothesis about the role of those proteins during transmission suggests that HC function is facilitating the virions retention with the cuticle of the food canal in aphids.

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

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

-Interactions in vitro between the helper (HC) with virions and the aphids mouthparts.

-RNA-mediated resistance by expressing nonstructural virus genes (HC) in transgenic plant with the possibility to interfere with the infection.

-Evaluations of methods in detection and production of several PPV spanish isolates and PVY HC monoclonal antibodies

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- INIA, SC93-184-C5-5. (1993-1996).
- CICYT, AGF94-0364. (1994-1995).
- CDTI-Empresa Weterm-Seed España S.A. nº 92104. (1994-1996).
- CICYT, PB94-0023. (1995-1998).
- CICYT, AGF95-0696. (1995-1998).
- CSIC-Academia de Ciencias Húngara (1995-1996).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Francisco Tenllado Peralo. Análisis de la estrategia de resistencia transgénica mediada por la replicasa viral frente al tobamovirus del moteado suave del pimiento. Universidad: Autónoma de Madrid, 1995. Director: J.R. Díaz-Ruíz.
- José María Tostado Álvarez. Estudios de la resistencia y protección mediada por la proteína de la cápsida frente a tobamovirus en plantas de los géneros *Capsicum* y *Nicotiana*. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Directora: M^a T. Serra Yoldi.
- Ana Isabel Sanz Molinero. El virus del mosaico del pepino. Análisis de la función de la proteína p3a y efecto de la expresión de secuencias derivadas del gen 3a en la infección viral. Universidad Autónoma de Madrid, 1996. Directora: I. García Luque.
- Jumana Trad Yunes. Caracterización de aislados españoles del virus de las manchas bronceadas del tomate y de sus RNAs defectivos interferentes/Characterization of spanish tomato spotted wilt virus isolates and their defective interfering RNAs. Universidad: Politecnica de Madrid, 1996. Director: J.R. Díaz-Ruíz.

Publicaciones/Publications

- Barón, M., Rahoutei, J., Lázaro, J.J., and García-Luque, I. (1995). PSII response to biotic and abiotic stress. In *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. P. Mathis, ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Vol. IV, pp. 897-900.
- Berzal-Herranz, A., De La Cruz, A., Tenllado, F., Díaz-Ruíz, J.R., López, L., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T., and García-Luque, I. (1995). The *Capsicum* L³ gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology* 209, 498-505.
- Canto, T., Ellis, P., Bowler, G., and López-Abella, D. (1995). Production of monoclonal antibodies to potato virus Y helper-protease and their use for strain differentiation. *Plant Disease* 79, 234-237.
- Canto, T., López-Moya, J.J., Serra-Yoldi, M.T., Díaz-Ruíz, J.R., and López-Abella, D. (1995). Different helper component mutations associated with lack of aphid transmissibility in two isolates of potato virus Y. *Phytopathology* 85, 1519-1524.
- López-Moya, J.J., Canto, T., Díaz-Ruíz, J.R., and López-Abella, D. (1995). Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox virus isolate with the aid of potato virus Y helper component. *J. Gen. Virol.* 76, 2293-2297.
- Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T., and Díaz-Ruíz, J.R. (1995). *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. *Virology* 211, 170-183.
- Díaz-Ruíz, J.R. (1996). ARNs satélites y ARNs defectivos interferentes. En *Patología Vegetal*. G. Llácer y col. eds. Valencia: (SEF-Phytoma, Agropubli S.L.), Tomo 1, Capítulo 4, pp.119-149.
- Ferreiro, C., Ostrówska, K., López-Moya, J.J., and Díaz-Ruíz, J.R. (1996). Nucleotide sequence and symptom modulating analysis of a peanut stunt virus-associated satellite rna from Poland: High level of sequence identity with the American psv satellites. *European J. Plant Pathol.* 102, 779-786.

- López-Moya, J.J. y López-Abella, D. (1996). Transmisión de virus de plantas por insectos vectores. En *Patología Vegetal*. G. Llacer, M.M. López, A. Traperó, A. Bello. M. V., eds. (Phytoma-España, Agropubli S.L.) Tomo I. Capítulo 9, pp. 275-300.
- Peñalver, R., Serra, M.T., Durán-Vila, N., and López, M.L. (1996). Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* B6 and *A. radiobacter* K84 to tomato root tips. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3530-3534.
- Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T., and Díaz-Ruiz, J.R. (1996). Resistance to pepper mild mottle tobamovirus conferred by the 54-kDa gene sequence in transgenic plants does not require expression of the wild-type 54-kDa protein. *Virology* **219**, 330-335.
- Vaquero, C., Sanz, A.I., Serra, M.T., and García Luque, I. (1996). Accumulation kinetics of CMV RNA 3-encoded proteins and subcellular localization. of the 3a protein in infected and transgenic tobacco plants. *Arch. Virol.* **141**, 987-999.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- De la Cruz, A., López, L., Tenllado, F., Díaz-Ruiz, J.R., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T., and García-Luque, I. (1997). The coat protein is required for the elicitation of the *Capsicum* L² gene-mediated resistance against tobamoviruses. *Molec. Plant-Microbe Interact.* **10**, 107-113.
- Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T., and Díaz-Ruiz, J.R. Pepper resistance-breaking tobamoviruses: can they coexist in single pepper plants?. *Eur. J. Plant Pathol.* (en prensa, 1997).
- López-Moya, J.J., López-Abella, S., Díaz-Ruiz, J.R., Martínez-García, B., and Gaborjaryi. Serological characterization of Hungarian PPV isolates. *Zeitschrift für Naturforschung* (en prensa, 1997).
- Meihua Chu, López-Moya, J. J., Llave-Correa, C., and Pirone, T.P. Two separate regions in the genome of Tobacco Etch Virus contain the determinants of the wilting response of tabasco pepper. *Molec. Plant-Microbe Interact.* (en prensa, 1997).

Artículos de Divulgación/*Press Articles*

- López Abella, D. (1996). Comentario: Análisis mutacional de los aminoácidos en la región N-terminal de la proteína de la cápsida implicados en la transmisión por áfidos de los potyvirus. *Virología* **1**, 29-31.
- Tenllado, F. y Díaz-Ruiz, J.R. (1996). Resistencia transgénica frente a los tobamovirus de pimiento mediada por la replicasa viral. *Phytoma* **84**, 38-43.
- Tenllado, F. y Díaz-Ruiz, J.R. (1996). Comentario: Disección genética y bioquímica de la resistencia frente a virus mediada por RNA. *Virología* **4**, 73-75.

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

Jefe de Departamento
Department Head

JUAN MANUEL RAMÍREZ DE VERGER LOBO

Profesores de Investigación

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

Investigadores Científicos

PALOMA LÓPEZ GARCÍA

Colaboradores Científicos

**SANTIAGO LAMAS
ALBERTO MARQUET ESPINOSA
EDUARDO RIAL ZUECO
GERMÁN RIVAS CABALLERO
LUIS RIVAS LÓPEZ**

Secretaria

M^a DEL CARMEN PARTEARROYO LACABA

Bioenergética Mitocondrial: Mecanismos Desacopladores

Mitochondrial Bioenergetics: Uncoupling Mechanisms

EDUARDO RIAL ZUECO

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

MARÍA DEL MAR GONZÁLEZ BARROSO

MERCEDES LÓPEZ SERRANO (DESDE X-1996)

B. Predoctorales/*Graduate Students*

PILAR ZARAGOZA JIMÉNEZ

Personal Técnico/*Technical Staff*

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

La fosforilación oxidativa mitocondrial engloba las reacciones que llevan a la síntesis de ATP utilizando la energía disponible tras la oxidación de sustratos en la cadena respiratoria. El acoplamiento de los dos procesos se realiza a través del gradiente de potencial electroquímico de protones que es generado por la cadena respiratoria durante la transferencia de electrones desde los sustratos hasta el oxígeno. Nuestro grupo investiga 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. Su actividad se encuentra regulada, siendo inhibida por nucleótidos de purina y activada por ácidos grasos. Por

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

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 possess an uncoupling protein (UCP) which catalyzes proton reentry into the matrix thus dissipating its electrochemical potential gradient. UCP activity is regulated, being inhibited by purine nucleotides and activated by fatty acids. UCP is a member of a protein superfamily that comprises the metabolite carriers of the mitochondrial inner membrane. The proteins of this family are all of 30-35 kDa, they present a

otra parte, la UCP es el miembro evolutivamente más reciente de la familia de transportadores de la membrana interna mitocondrial. Esta familia de proteínas está formada por polipéptidos de 30-35 kDa en los que se repite tres veces una secuencia de unos 100 aminoácidos, habiéndose demostrado la presencia de seis dominios transmembranares. Las semejanzas estructurales tienen su prolongación en el mecanismo de transporte ya que, salvo dos excepciones, son antiportadores con un mecanismo de tipo secuencial. Recientemente se ha comprobado otra peculiar propiedad común: la actividad antiportadora puede ser transformada en uniporte al modificar determinadas cisteínas. Esta situación *artefactual* es reversible y lleva a la pérdida casi total de la especificidad. Este hecho ha llevado a la propuesta de la existencia, en el interior de la proteína, de un canal intrínseco inespecífico que se encontraría encubierto tras dominios particulares que conferirían al transportador sus propiedades específicas.

Nuestro objetivo es establecer los dominios de la UCP implicados en la determinación de la especificidad por la especie a transportar y los implicados en su regulación. Debido a que los estudios para la localización del centro de unión del nucleótido han revelado que la región comprendida entre la quinta y sexta α -hélice interacciona con éste y a que hemos demostrado que la delección de los residuos 261 al 269 lleva a la formación de un canal de muy baja especificidad, nuestro trabajo se centra en el estudio de las relaciones estructura-función en el tercio carboxi-terminal de la UCP.

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

threefold sequence repeat of about 100 amino acids and with six transmembrane domains. These structural similarities are also reflected in the functional properties and thus, with two exceptions, they are antiporters with a sequential mechanism. More recently another peculiar property has been described: chemical modification of particular cysteine residues switches the antiport activity to a uniport mode that is also characterized by a loss of specificity. This artefactual transport mode can be fully reversed. This fact has led to the proposal of the existence, within the protein, of an intrinsic channel which would be hidden by the domains that confer the specific transport properties to each carrier.

Our main objective is to determine the domains in UCP that confer the specificity to the protein and that are implicated in its regulation. Since the work on the localization of the nucleotide binding site have revealed that a region between the fifth and sixth α -helix interacts with the nucleotide and since we have shown that deletion of residues 261 to 269 leads to the formation a channel with low specificity, our work is centred on the study of the structure-function relationships in the last third of UCP.

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

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, BIO93-0544-C03-02. (1993-1996).
- DGES, PB95-0118. (1996-1999).

Publicaciones/Publications

- Díaz-Achirica, P., Prieto, S., Ubach, J., Andreu, D., Rial, E., and Rivas, L. (1995). Permeabilization of rat liver mitochondria by cecropin A-melittin hybrid peptides. In *Peptides 1994*, H.L.S. Maia, ed. (Leiden: Escom), pp. 777-778.
- Prieto, S., Bouillaud, F., and Rial, E. (1995). The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in *S. cerevisiae*. *Biochem. J.* *307*, 657-661.
- González-Barroso, M.M., Fleury, C., Arechaga, I., Zaragoza, P., Levi-Meyrueis, C., Raimbault, S., Ricquier, D. Bouillaud, F., and Rial, E. (1996). Activation of the uncoupling protein by fatty acids is modulated by mutations in the C-terminal region of the protein. *Eur. J. Biochem.* *239*, 445-450.
- Prieto, S., Bouillaud, F., and Rial, E. (1996). The nature and regulation of the ATP-induced anion permeability in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* *334*, 43-49.

Biología Estructural y Funcional de Factores Endoteliales Vasoactivos

Structural and Functional Biology of Endothelial Vasoactive Factors

Grupo/Group 1:

GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO
Jefe de Grupo/Group Leader
Investigador/Senior Investigator

ROSA LOZANO
JESÚS MIGUEL SANZ

Investigadores Asociados/Associate Researchers

ANTONIO PINEDA LUCENA (HASTA VIII-1995)
MARIANO REDONDO HORCAJO (DESDE IX-1995)
B. Predoctorales/Graduate Students

MERCEDES ZAZO GUÍO
Personal Técnico/Technical Staff

Grupo/Group 2:

JUAN MANUEL RAMÍREZ DE VERGER
Jefe de Grupo/Group Leader
Investigador/Senior Investigator

MARÍA LUISA NAVARRO RICO
B. Predoctoral/Graduate Student

CONCEPCIÓN FERNÁNDEZ CABRERA
Personal Técnico/Technical Staff

Grupo/Group 3:

SANTIAGO LAMAS

Jefe de Grupo/Group Leader
Investigador/Senior Investigator

DOLORES PÉREZ-SALA GOZALO
Investigadora Asociada/Associate Research

MANUELA DÍAZ CAZORLA
OCTAVIO HERNÁNDEZ PERERA
F. JAVIER NAVARRO ANTOLÍN (DESDE V-1996)
RAFAEL SÁNCHEZ-PASCUALA (DESDE III-1996)
MARTA SAURA REDONDO (HASTA III-1996)
B. Predoctorales/Graduate Students

ROSA MARTÍNEZ DALMAU (HASTA XII-1995)
Personal Técnico/Technical Staff

Palabras clave: Endotelio, factor de crecimiento para fibroblastos, estructura, óxido nítrico sintasas, inflamación.

Nuestros laboratorios están orientados a la caracterización de proteínas que intervienen en los sistemas de regulación fisiológica endotelial. El Dr. Giménez Gallego dirige desde hace años dos líneas de investigación sobre una familia de proteínas denominadas factores de crecimiento para fibroblastos, implicadas, entre otros muchos efectos, en la angiogénesis y el tono vascular. La primera línea de ellas va dirigida a establecer las bases estructurales de las propiedades biológicas de estas proteínas con objeto de favorecer el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a tratar enfermedades causadas por defecto o exceso de actividad de estas proteínas. En este contexto, utilizando análogos funcionales de la heparina se han podido establecer las bases estructurales de la activa-

Keywords: Endothelium, fibroblast growth factors, structure, nitric oxide synthases, inflammation.

Our laboratories are oriented towards the characterization of proteins participating in the physiological regulation of endothelium. Dr. Giménez Gallego has been involved for several years in two main lines of research concerning the family of fibroblast growth factors (FGFs) which regulate, among other functions, angiogenesis and vascular tone. The first is related to the structural basis of the biological functions of these proteins and pursues the development of new drugs useful for the treatment of diseases where FGFs are involved. In this context, with the use of heparin functional analogs, the structural basis for FGF activation by heparin has been established. In addition, several inhibitors of FGF activity and their structural interactions have been determined. The second area of research has to do with the explo-

ción de estas proteínas por este modulador fisiológico de su actividad. Igualmente se han encontrado diversos inhibidores del factor de crecimiento para fibroblastos y han podido establecerse las relaciones estructura-función de estos efectos. La segunda línea, desarrollada en colaboración con el grupo del Dr. Santiago Lamas y del Dr. Pedro Cuevas (Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid) va destinada a seguir profundizando en las funciones fisiológicas del factor de crecimiento para fibroblastos. El grupo del Dr. Giménez Gallego presta ayuda en el terreno de la química de proteínas en el estudio de otros temas abordados por estos laboratorios.

El grupo del Dr. Santiago Lamas está interesado en el estudio de factores de la pared vascular con capacidad vasoactiva e implicados en la regulación molecular del tono vascular y en la respuesta inflamatoria renal. En la vertiente endotelial se ha centrado el estudio en la regulación de la expresión génica de la óxido nítrico sintasa constitutiva (NOS-3) en respuesta a estímulos inductores de daño endotelial y en situaciones fisiopatológicas como la cirrosis hepática. En células mesangiales de riñón de rata y humano se estudian dos enzimas, la NOS-2 o NOS inducible y la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) y su regulación transcripcional y postraduccional. En colaboración con el Prof. Giménez Gallego se ha estudiado la correlación entre los niveles de FGF y NOS-3 en una situación de hipertensión crónica y el papel del FGF en la corrección de esta situación. Finalmente se ha caracterizado de una nueva isoforma de NOS en plantas leguminosas, cuya presencia funcional hemos descrito en colaboración con un grupo del Instituto de Ciencias Medioambientales del CSIC.

Paralelamente a su colaboración en la línea principal del grupo, el laboratorio del Dr. J. M. Ramírez 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 apoproteína. En concreto, se estudia la contribución de las regiones extramembranales de la proteína LHII a su estructura terciaria y cuaternaria.

ration of new physiological roles for FGFs and is developed in collaboration with Dr. Santiago Lamas and Dr. Pedro Cuevas (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid). Dr. Giménez Gallego's group also gives support in the field of protein chemistry to diverse ongoing projects in these laboratories.

Dr. Santiago Lamas's group is interested in the study of vasoactive factors within the vascular wall involved in the molecular regulation of vascular tone and renal inflammatory response. In endothelial cells the studies are focused on the regulation of the constitutive nitric oxide synthase expression (NOS-3) in response to injury and in pathophysiological situations such as cirrhosis. In renal human and rat mesangial cells two enzymes, NOS-2 (inducible NOS) and cyclooxygenase type 2 (COX-2) and their transcriptional and posttranslational regulation are main objects of study. In collaboration with Prof. Giménez Gallego we have studied the correlation of NOS-3 and FGF in chronic hypertension and the role of FGF in the correction of this situation. Finally, we are interested in the characterization of a new NOS isoform in lupin plants, whose functional presence has been described in collaboration with a group at the Instituto de Ciencias Medioambientales from CSIC.

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 apoprotein. More specifically, the contribution of extramembrane regions of LHII protein to the tertiary and quaternary structure is studied.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PM 92-0008-C02-01. (1993-1995).
- CICYT, BIO 93-0544-C03-01. (1994-1996).
- DGICYT, PB-93 0044. (X-1994 a X-1997).
- CICYT, BIO96-0411. (1996-1998).
- CAM, AE 00418. (1995).
- Biomed 2, Acción Concertada BMH4-CT96-0979.
- Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas (IRSIN).
- Parke-Davis S.A.

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Antonio Pineda Lucena. Estructura tridimensional en solución del factor de crecimiento para fibroblastos ácido (FGF) libre y unido a inositol hexasulfato. Implicaciones biológicas. Universidad Autónoma de Madrid, 1995. Director: Guillermo Giménez-Gallego.
- Isabel Muñoz Willery. Implicación del residuo 118 del factor de crecimiento para fibroblastos ácido en su interacción con heparina y en sus propiedades biológicas. Universidad Autónoma de Madrid, 1995. Director: Guillermo Giménez Gallego.
- Marta Saura Redondo. Regulación de la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible en células mesangiales de rata. Universidad de Alcalá, 1995. Directores: Santiago Lamas y Manuel Rodríguez Puyol.

Publicaciones/Publications

- Balligand, J.L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W., Kopzik, L., Lamas, S., Lowenstein, C.L., Kelly, R.A., Smith, T.W., and Michel, T. (1995). Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 -and IFN-. *Am. J. Physiol.* 268, H1293-H1303.
- Brady, H.R., Lamas, S., Papyiani, K., Takata, S., Brenner, B.M., and Marsden P.A. (1995). Transcellular biosynthesis of lipoxigenase products during interaction of neutrophils and glomerular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 268, F1-F12.
- Bueno, P., Varela, J., Giménez-Gallego, G., and del Rio, L.A. (1995). Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiol.* 108, 1151-1160.
- Cuevas, P., Carceller, F., and Giménez-Gallego, G. (1995). Acidic fibroblast growth factor prevents post-axotomy neuronal death of the newborn rat facial nerve. *Neurosci. Lett.* 197, 183-186.
- Cuevas, P., Carceller, F., and Giménez-Gallego, G. (1995). Acidic fibroblast growth factor prevents death of spinal cord motoneurons in newborn rats after nerve section. *Neurol. Res.* 17, 396-399.
- Fu, X., Cuevas, P., Gimenez-Gallego, G., Sheng, Z., and Tian, H. (1995). Acidic fibroblast growth factor reduces rat skeletal muscle damage caused by ischemia and reperfusion. *Chin. Med. J. Engl.* 108, 209-214.
- Leivas, A., Jiménez, W., Lamas, S., Bosch, M., Oriola, J., Clària, J., Arroyo, V., Rivera, F., and J. Rodés. (1995). Endothelin-1 does not play a major role in the homeostasis of arterial pressure in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 108, 1842-1848.
- Mena, M.A., Casarejos, M.J., Giménez-Gallego, G., and García de Yébenes, J. (1995). Fibroblast growth factors: structure-activity on dopamine neurons *in vitro*. *J. Neural. Transm.* 9, 1-14.
- Pérez-Sala, D., and Mollinedo, F. (1995). Inhibition of N-linked glycosylation induces early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *J. Cell. Physiol.* 163, 523-531.

- Pérez-Sala, D., Collado-Escobar, D., and Mollinedo, F. (1995). Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J. Biol. Chem.* *270*, 6235-6242.
- Rebollo, A., Gómez, J., Martínez de Aragón, A., Lastres, P., Silva, A., Pérez-Sala, D. (1995). Apoptosis induced by IL-2 withdrawal is associated with an intracellular acidification. *Exp. Cell. Res.* *218*, 581-585.
- Ros, J., Jiménez, W., Lamas, S., Clària, J., Arroyo, V., Rivera, F., and Rodés, J. Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. (1995). *Hepatology* *21*, 554-560.
- Ruiz-Echevarría, M.J., Giménez-Gallego, G., Sabariego-Jareño, R., and Díaz, R. (1995). Kid, 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.* *247*, 568-577.
- Saura, M., and Lamas, S. (1995). Regulación de la óxido nítrico sintetasa inducible glomerular. *Nefrología XV*, 411-16.
- Saura, M., López, S., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., and Lamas, S. (1995). Regulation of inducible nitric oxide expression in rat mesangial cells and isolated glomeruli. *Kidney Int.* *47*, 500-509.
- Saura, M., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., and Lamas, S. (1995). Papel de los glucocorticoides en la regulación de la expresión de la óxido nítrico sintetasa en células mesangiales de rata. *Nefrología XV* (5), 456-63.
- Zurdo, J., Centeno, M. A., Odriozola, J. A., Fernández-Cabrera, C., and Ramírez, J. M. (1995). The structural role of the carotenoid in the bacterial light-harvesting protein 2 (LH2) of *Rhodobacter capsulatus*. A Fourier transform Raman spectroscopy and circular dichroism study. *Phot. Res.* *46*, 363-314.
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J, Lamas, S., and Golvano, M.P. (1996). Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters* *398*, 159-164.
- Cuevas, P., Fernández-Ayerdi, A., Carceller, F., Colin, S., Mascarelli, F., Muñoz-Willery, I., and Giménez Gallego, G. (1996). Central nervous system distribution of fibroblast growth factor injected into the blood stream. *Neurol. Res.* *18*, 267-272.
- Cuevas, P., García-Calvo, M., Carceller, F., Reimers, D., Zazo, M., Cuevas, B., Muñoz-Willery, I., Martínez-Coso, V., Lamas, S., and Giménez-Gallego, G. (1996). Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 11996-12001.
- Cuevas, P., Giménez Gallego, G. (1996). Antiepileptic effects of acidic fibroblast growth factor examined in kainic acid-mediated seizures in the rat. *Neurosci. Lett.* *203*, 66-68.
- Cuevas, P., Prieto, R., Saenz de Tejada, I., and Giménez Gallego, G. (1996). Analgesic effects of fibroblast growth factor in the rat. *Neurosci. Lett.* *207*, 1-4.
- Galán, J.M., Cuevas, B., Dujovny, N., Giménez-Gallego, G., and Cuevas, P. (1996). Sleep promoting effects of intravenously administered acidic fibroblast growth factor. *Neurol. Res.* *18*, 567-569.
- Guaza, C., García Andrés, C., Sandi, C., Muñoz-Willery, Y., Cuevas, P., and Giménez-Gallego, G. (1996). Fibroblast growth factor decreases locomotor activity in rats. *Neuroscience* *75*, 805-813.
- López Ongil, S., Saura, M., Lamas, S., Rodríguez Puyol, M., and Rodríguez Puyol, D. (1996). Recombinant human erythropoietin does not regulate the expression of endothelin-1 and constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Exp. Nephrol.* *4*, 37-42.
- López-Ongil, S., Saura, M., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., and Lamas, S. (1996). Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* *271*, H1072-H1078.
- Lozano, R. M., Wong, J., Yee, B., Peters, A., Kobrehel, K., and Buchanan, B. B. (1996). New evidence for a role for thioredoxin *h* in germination and seedling development. *Planta* *200*, 100-106.

- Morales-Ruiz, M., Jiménez, W., Pérez-Sala, D., Ros, J., Leivas, A. Lamas, S., Rivera, F., and Arroyo, V. (1996). Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 24, 1481-1486.
- Pineda-Lucena, A., Jiménez, M.A., Lozano, R.M., Nieto, J.L., Santoro, J., Rico, M., and Giménez-Gallego, G. (1996). Three-dimensional structure of the acidic fibroblast growth factor in solution: effects of binding to a heparin functional analogue. *J. Mol. Biol.* 264, 162-178.
- Renaud, F., Desset, S., Oliver, L., Giménez-Gallego, G., Van Obberghen, E., Courtois, Y., and Laurent, M. (1996). The neurotrophic activity of FGF1 depends on endogenous FGF1 expression and is independent of the map kinase cascade pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 2801-2811.
- Romero, A., Pineda-Lucena, A., and Giménez-Gallego, G., (1996). X-ray analysis structure of native full length human fibroblast growth factor at 0.25 nm resolution. *Eur. J. Biochem.* 241, 453-461.
- Rosa-Fraile, M., Sampedro, A., Ruiz-Bravo, A., Sanbonmatsu, S., and Giménez-Gallego, G. (1996). Identification of serum and urine proteins responsible for enhanced pigment production by group b streptococci as amylases. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 3, 594-596.
- Saura, M., Martínez-Dalmau, R., Minty, A., Pérez-Sala, D., and Lamas, S. (1996). Interleukin-13 inhibits inducible nitric oxide expression in human mesangial cells. *Biochem. J.* 313, 641-646.
- Saura, M., Pérez-Sala, D., Cañada, F. J., and Lamas, S. (1996). Role of tetrahydrobiopterin availability in the regulation of nitric oxide synthase expression in human mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 271, 14290-14295.
- Saura, M., Zaragoza, C., Martínez-Dalmau, R., Pérez-Sala, D., and Lamas, S. (1996). Avances en el estudio de la regulación de la síntesis de NO en la célula mesangial. *Nefrología XVI*, 35-39.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Lamas, S., and Michel, T. Molecular biological features of nitric oxide synthase isoforms. In *Nitric oxide and the lung*, W. Zapol, ed. (New York: Marcel Dekker) pp. 59-73. (1997).
- Lamas, S., and Michel, T. Endothelium-derived nitric oxide and control of vascular tone. In *Textbook of Molecular Medicine*, L. Jameson ed. (Blackwell Scientific.). (1997).
- Michel, T., Lamas, S. and Sase, K. Molecular biology of nitric oxide synthases. In *Molecular Biology of the Cardiovascular System*, A. Marks and M. Taubman, eds., (New York: Marcel Dekker) (1997).
- Rivas-Cabañero, L., Rodríguez-López, A.M., Martínez-Salgado, C., Saura, M., Lamas, S. and López-Novoa, J.M. Gentamicin treatment increases mesangial nitric oxide production. *Exp. Nephrol.*, (1977).

Artículos de Divulgación/Press Articles

- Hernández-Perera, O., and Lamas, S. (Julio 1995). Oxido Nítrico: Fisiopatología. *Investigación y Ciencia*. pp. 34-36.

Biología Molecular de Bacterias Gram-positivas

Molecular Biology of Gram-positive Bacteria

PALOMA LÓPEZ GARCÍA

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigadora/*Senior Investigator*

DJAMEL DRIDER

B. Postdoctoral/*Postdoctoral Fellow*

MÓNICA AMBLAR ESTEBAN

NIEVES GARCÍA QUINTANS

B. Predoctorales/*Graduate Students*

M^º ANGELES CORRALES GONZÁLEZ

PEDRO VALIENTE MARTÍNEZ(A TIEMPO PARCIAL)

Personal Técnico/*Technical Staff*

Regulación de la expresión del sistema de transporte de citrato de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*

Las bacterias lácticas son importantes en la producción de alimentos fermentados debido a sus propiedades acidificantes y a su metabolismo heterofermentativo. La utilización de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* (*L. diacetylactis*) como productor del aroma de quesos y mantequillas depende de su capacidad para sintetizar diacetilo a partir de citrato. La primera etapa de la utilización del citrato es su transporte al citoplasma celular. En *L. diacetylactis* esta incorporación está catalizada por la citrato permeasa P (CitP). Nuestro grupo está realizando la caracterización bioquímica y molecular de este sistema de transporte de citrato. Hemos establecido que la única proteína requerida para el transporte de citrato es CitP. La actividad de esta permeasa es dependiente de los dos componen-

Regulation of expression of the citrate transport system of Lactococcus lactis biovar diacetylactis

In the dairy industry, lactic acid bacteria are important for their acidifying properties and their heterofermentative metabolism. The use of *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* (*L. diacetylactis*) as a flavor producer depends on its ability to synthesize diacetyl from citrate. The first step of the citrate utilization is its transport by the cells. This uptake is catalyzed by the citrate permease P (CitP). Our group is involved in the characterization of this transport system at the biochemical and molecular levels. We have established that the citrate uptake depends on the two components of the proton-motive force: the membrane potential and the pH gradient. These findings suggest an electrogenic proton symport mechanism for citrate transport in lactococci. The CitP is the only protein required for the uptake of citrate. The permease is encoded by the plasmidic *citP* gene, which is a cons-

tes de la fuerza protonmotriz: el potencial de membrana y el gradiente de pH. Estos resultados sugieren un mecanismo de cotransporte de Cit^{2-} y protones en *L. diacetylactis*. La CitP está codificada por el gen plasmídico *citP*, que forma parte del operón *citQRP*. Este operón se transcribe primordialmente en *L. diacetylactis* a partir de un promotor P1, localizado a 1 kb del gen *citQ*. Hemos mostrado que la región líder contiene una secuencia de inserción (IS), que está también presente en varias copias en el cromosoma bacteriano. La introducción de la IS en el plásmido pCIT264 ha dotado al operón *cit* de los promotores P2 y P2'. P2 contribuye a la expresión del operón en *L. diacetylactis*, mientras que P2' es el único promotor reconocido por la RNA polimerasa de *Escherichia coli* y permite la transcripción de *citP* en el huésped heterólogo. La expresión del operón *citQRP* está controlada a nivel transcripcional y post-transcripcional. La región central del gen *citQ* y el extremo 5' del gen *citR* están incluidos en una estructura secundaria compleja, que constituye un sitio de procesamiento del mRNA *cit*. Así, parece que CitQ es un péptido líder cuya traducción impide la formación de la estructura secundaria y permite la síntesis del represor CitR (producto del gen *citR*), que inhibe la expresión de *citP*. Por otra parte, la transcripción del operón a partir de P1 es inducida por la acidificación del medio de cultivo. Esta inducción es abolida por la adición de CitR en trans. Los niveles máximos de síntesis de CitP se observan en cultivos lactocócicos crecidos a pH 4.5. Además, la máxima actividad de CitP se detecta en rangos de pH de 4.5-5.5. Así, parece que la activación de este sistema de transporte está diseñado en *L. diacetylactis* para optimizar la utilización de citrato sin efectos deletéreos. Nuestro modelo de trabajo propone que a pH neutro, los bajos niveles de CitP y su baja actividad impedirían la incorporación de citrato por la célula. Esta situación impediría los efectos de toxicidad producidos por la acumulación intracelular de citrato no metabolizado. La acidificación del medio de cultivo durante las fermentaciones lácticas conllevaría a un incremento gradual del transporte de citrato debido a la inducción de la síntesis de CitP y a una mayor actividad de la permeasa preexistente. Finalmente, se alcanzaría la incorporación más eficiente del citrato en condiciones óptimas para su metabolismo en *L. diacetylactis*. Esta regulación se enmarcaría en la respuesta adaptativa bacteriana al stress ácido y es la primera vez que se ha detectado en *Lactococcus lactis*.

tient of the *citQRP* operon. In *L. diacetylactis* the transcription of the operon is primary driven from the P1 promoter, which is located 1 kb upstream of the *citQ* gene. We have shown that the long leader region contains an insertion sequence (IS). Several copies of the IS are also present in the lactococcal chromosome. The introduction of the IS in the pCIT264 plasmid has provided to promoters (P2 and P2') to the *citQRP* operon. P2 contributes to the expression of the operon in *L. diacetylactis*, whereas P2' is the only promoter recognized by the *Escherichia coli* RNA polymerase and allows the transcription of *citP* in the heterologous host. The expression of the *citQRP* operon is controlled at the transcriptional and post-transcriptional levels. We have established that the *citQRP* mRNA is processed at a complex secondary structure. This structure contains the central region of the *citQ* gene at the 5'-end of the *citR*. Thus, it seems that CitQ is a leader peptide, whose translation avoid formation of the secondary structure and allows synthesis of the CitR repressor (*citI* gene product), which inhibits expression of *citP*. Moreover, transcription of the *citQRP* operon is induced by the acidification of the growth medium. This induction is abolished by supplementing CitR in trans. The maximum levels of CitP are obtained from lactococcal cultures grown at pH 4.5. Moreover, the maximum transport activity of CitP is observed within a pH range of 4.5-5.5. Therefore, the activation of this transport system seems to be designed to optimize citrate utilization by *L. diacetylactis* without deleterious effects. Our working model proposes that, at neutral pH, the low levels and activity of CitP should not permit citrate transport inside the lactococcal cells. This situation should avoid cell toxicity produced by intracellular accumulation of unmetabolized citrate. Furthermore, the acidification of the medium, during dairy fermentations, should result in a gradual increase of citrate transport due to induction of CitP synthesis and to higher activity of the preexisting permease. Finally, the most efficient citrate uptake will be reached at optimal conditions for its metabolism in *L. diacetylactis*. This regulation seems to belong to the bacterial adaptive response to acidic stress and this is the first instance of its existence in *Lactococcus lactis*.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, Boehringer Mannheim, PTR93-0037. (1993-1995).
- UE, ERBC11.CT940016. (1995-1997).
- CICYT, BIO95-0795. (1995-1997).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Félix López de Felipe Toledano. Caracterización de la expresión génica del operón *citQRP* de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Directora: P. López.

Publicaciones/Publications

- López de Felipe, F., Magni, C., de Mendoza, D., and López, P. (1995). Organization and regulation of the *L. lactis* biovar *diacetylactis* citrate utilization gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 246, 590-599.
- López, P., Greenberg, B., and Lacks, S.A. (1995). A cluster of four genes encoding enzymes for five steps in the folate biosynthetic pathway of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 177, 66-74.
- López de Felipe, F., Magni, C., de Mendoza, D., and López, P. (1996). Transcriptional activation of the citrate permease P gene of *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* by an insertion sequence-like element present in plasmid pCIT264. *Mol. Gen. Genet.* 250, 428-436.
- Magni, C., López de Felipe, F., López, P., and de Mendoza, D. (1996). Characterization of an insertion sequence-like element identified in plasmid pCIT264 from *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 136, 289-295.
- Magni, C., López, P., and de Mendoza, D. (1996). The properties of citrate transport catalyzed by CitP of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 265-269.

Bioquímica de Leishmania. Péptidos Eucarióticos con Función Antibiótica *Biochemistry of Leishmania. Antibiotic Peptides from Eukaryotes*

LUIS RIVAS LÓPEZ

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

ALMUDENA GUINEA DÍAZ

SUSANA SERRANO BARRERO

OCTAVIO MIGUEL RIVERO LEZCANO (DESDE X-1995)
Investigadores Asociados/*Associate Researchers*

ENRIQUE ALVAREZ FORTES

CARMEN CHICHARRO GONZALO (HASTA VI-1996)

PILAR DÍAZ-ACHIRICA

B. Predoctorales/*Graduate Students*

Palabras clave: *Leishmania*, péptidos antibióticos, proteína desacoplante, transducción de señales, diseño de fármacos.

I.- Mecanismo de acción de péptidos eucarióticos con función leishmanicida

Las cecropinas son péptidos monocatenarios implicados en la defensa de los insectos frente a agentes infecciosos. Se ha continuado el estudio de las posibles aplicaciones terapéuticas de péptidos sintéticos híbridos cecropina A-melitina en:

1.- Definición de la interacción del péptido híbrido cecropina A-melitina sobre membranas modelo. Existe una colaboración con el Prof. J. Gavilanes (Universidad Complutense de Madrid) sobre el estudio de la interacción y cambios conformacionales del péptido CA(1-8)M(1-18) en liposomas de diferente composición en fosfolípidos, así como el mecanismo de lisis por efecto detergente del péptido sobre los mismos.

I.- Mechanisms of action of eukaryotic peptides on Leishmania

Keywords: *Leishmania*, *antibiotic peptides*, *uncoupling protein*, *signal transduction*, *drug design*.

Cecropins are peptides devoid of intrachain disulfide bonds, involved in the defense mechanism of Insects against infectious agents. We have studied some therapeutic applications of synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides on Leishmania.

1.- *Interaction of the cecropin A-melittin hybrid peptide CA(1-8)M(1-18) with liposomes. In collaboration with Prof. J. Gavilanes (University of Madrid) we have studied the interaction of the peptide with liposomes of different phospholipid composition, as well as conformational changes induced in the peptide after binding to the membrane, and the lysis mechanism by a detergent activity of the peptide.*

2.- Mecanismo letal de CA(1-8)M(1-18) sobre promastigotes de *Leishmania*. CA(1-8)M(1-18) actúa sobre *Leishmania* a concentración micromolar, por permeabilización de la membrana plasmática, con colapso del potencial de membrana y pérdida de los niveles de ATP intracelulares. El lipídofosfoglicano, componente aniónico mayoritario de la membrana plasmática actúa como mecanismo de protección parcial del parásito. El péptido actúa sobre cepas multirresistentes de *Leishmania* y sinergiza con fármacos que afectan el nivel de esteroides de membrana.

3.- Mecanismo letal de CA(1-8)M(1-18) sobre amastigotes de *Leishmania*. El péptido, encapsulado a baja concentración en liposomas, es capaz de eliminar amastigotes intracelulares en macrófagos infectados; su aplicación tópica elimina las úlceras producidas en ratones infectados con *L. major*. En colaboración con el Dr. L. Boscá (Instituto de Bioquímica, CSIC), se ha estudiado la producción de óxido nítrico por inducción de iNOS, así como apoptosis sobre líneas macrofágicas murinas por CA(1-8)M(1-18).

En la actualidad se estudian nuevos análogos naturales y sintéticos, con el fin de conseguir mejores péptidos leishmanicidas.

II.- Regulación del metabolismo energético de *Leishmania*

El metabolismo energético es el blanco de acción de diversos fármacos contra *Leishmania*. La contribución de la mitocondria al mismo se ha definido por transfección de promastigotes de *Leishmania major* con la proteína desacoplante de mitocondrias de hámster (UCP), como nuevo modelo farmacológico con inhibición de la fosforilación oxidativa, para el examen de nuevas drogas y dianas terapéuticas alternativas; la funcionalidad de los parásitos transfectados con UCP ha sido estudiada con el Dr. E. Rial (CIB, CSIC); los parásitos transfectados expresan UCP, localizada por microscopía electrónica en la mitocondria del parásito, hay incremento del consumo de oxígeno, y disminución del potencial de membrana mitocondrial. Como alternativa al déficit energético mitocondrial, los parásitos sufren alteraciones en los niveles de metabolitos relacionados con la glucólisis, estudiados mediante RMN de ^{13}C y ^1H con el Dr. S. Cerdán (I. Investigaciones Biomédicas, CSIC).

2.- Mechanism of action of CA(1-8)M(1-18) on *Leishmania* promastigotes. CA(1-8)M(1-18) kills *Leishmania* promastigotes at a micromolar range of concentration by permeabilization of the plasma membrane, with loss of membrane potential and drop in ATP intracellular levels; lipophosphoglycan, a major anionic oligosaccharide in the membrane acts as a partial defense mechanism against the peptides; furthermore, the peptide is active also on multidrug-resistant *Leishmania* strains and synergizes with drugs affecting the sterol levels in the membrane.

3.- Liposome-encapsulated CA(1-8)M(1-18) peptide eliminates intracellular *Leishmania* amastigotes inside macrophages, and as a topical application heals ulcers produced in mice by *L. major* infection; in collaboration with Dr. L. Boscá (Instituto de Bioquímica (CSIC)), we have demonstrated induction of iNOS, NO production and apoptosis on murine macrophage lines by CA(1-8)M(1-18).

At present we are testing new natural and synthetic antibiotic peptides with the aim to develop a better leishmanicidal peptide.

II.- Regulation of energetic metabolism in *Leishmania*

Energetic metabolism of the parasite is the target of several leishmanicidal drugs; to define the mitochondrial contribution to this process, we have transfected *L. major* promastigotes with the uncoupling protein (UCP) from hamster to reduce oxidative phosphorylation in the parasite, and to develop a new pharmacological model for testing new drugs, as well as secondary targets of those already in use. UCP transfected parasites express the protein, which is located in mitochondria, and in collaboration with Dr. E. Rial (CIB, CSIC) we have observed in UCP transfected promastigotes an increase in oxygen consumption rate, and decrease in mitochondrial membrane potential. At present we are studying glycolysis as a energetic bypass for the uncoupled parasites by measuring the levels of different metabolites by ^{13}C - and ^1H - NMR in collaboration with Dr. S. Cerdán (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC), as well as drugs directed acting on mitochondrial function.

III.- Signal transduction in stage-transformation in *Leishmania*

We have studied changes in tyrosine phosphorylation pattern of promastigotes after drop in pH and other factors involved in

III.- Señales implicadas en la transformación interestadío en *Leishmania*

Hasta el presente se ha estudiado la variación en los patrones de fosforilación en tirosina inducida por cambios en el pH y otros agentes implicados en la transformación promastigote-amastigote. Se proseguirá mediante la clonación y definición de las correspondientes quinasas y sus sustratos.

initial steps of promastigote-amastigote transformation; currently we are cloning the corresponding kinases and their substrates.

Organismos Financiadores/ Funding Agencies

- DGICYT, BIO92-0936-C02-01. (1993-1995).
- DGICYT, SAF95-0019. (1995-1998).

Publicaciones/Publications

- Díaz-Achirica, P., Prieto, S., Ubach, J., Andreu, D., Rial, E., and Rivas, L. (1995). Permeabilization of rat liver mitochondria by cecropin A-melittin hybrid peptides. In Peptides 1994. H.L.S. Maia, ed. (Leiden, ESCOM). pp. 777-778.
- Díaz-Achirica, P., Guinea, A., Ubach, J., Andreu, D., and Rivas, L. (1996). Mechanism of action of cecropin A-melittin hybrid peptides on *Leishmania* parasites. In Peptides. Chemistry, Structure and Biology. P.T.P. Kaumaya and R.S. Hodges, eds. (Boston, Mayflowers), pp. 183-185.
- Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Díaz-Achirica, P., Martínez del Pozo, A., Andreu, D., Rivas, L., and Gavilanes, J. (1996). Release of lipid vesicle contents by an antibacterial cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biochemistry* 35, 9892-9899.
- Kima, P., Soong, L., Chicharro, C., Ruddle, N. H., and McMahon-Prett, D. (1996) *Leishmania* infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4⁺ cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 3163-3169.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Rivero-Lezcano, O-M., Chicharro, M.C., and Rivas, L. (1997). Acidic pH stress induces tyrosine phosphorylation in *Leishmania pifanoi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84,123-128.
- Fresno, M., Kopf, M., and Rivas, L. Cytokines in infectious diseases. *Immunol. Today* (1997),56-58.
- Velasco, M., Díaz-Guerra, M.J.M., Díaz-Achirica, P., Andreu, D., Rivas, L., and Boscá, L. Macrophage triggering with Cecropin A - Melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression. *J. Immunol.* (en prensa, 1997).

Estructura e Interacciones de Tubulina y Taxol

Structure and Interactions of Tubulin and Taxol

JOSÉ M. ANDREU MORALES
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

ROSARIO GIL ALVAREZ
M. GRACIELA PUCCIARELLI MORRONE
Investigadores Asociados/*Associate Researchers*

DANIEL G. LEYNADIER (HASTA XI-1996)
THOMAS SPISSIGER (II-1995 A II-1996)
B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

JOSE M. DE PEREDA VEGA (HASTA V-1996)
JUAN A. EVANGELIO PALOMO
PABLO CHACÓN MONTES
B. Predoctorales/*Graduate Students*

JOSÉ MORALES ALVÁREZ (HASTA II-1996)
ROSA MARTÍNEZ-DALMAU (DESDE II-1996)
Personal Técnico/*Technical Staff*

Palabras clave: Proteínas, microtúbulos, tubulina, FtsZ, taxol.

Microtúbulos. α - β - y γ -tubulina son proteínas (Mr 50000) del citoesqueleto eucariótico. El dímero de $\alpha\beta$ -tubulina ensambla reversiblemente formando los microtúbulos, mientras que γ -tubulina está implicada en su organización. Los microtúbulos son largos cilindros huecos y dinámicos que dirigen la arquitectura celular y el tráfico intracitoplásmico, 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 antimitóticas como colchicina y taxol. La tubulina está regulada por la unión del fosfato gamma del GTP y un ión Mg^{2+} coordinado. Al ensamblar se hidroliza GTP unido al sitio intercambiable de la subunidad β , y la tubulina se transforma en el estado inactivo ligado a GDP. La única proteína conocida

Keywords: *Proteins, microtubules, tubulin, FtsZ, taxol.*

Microtubules. α - β - and γ -tubulin are eukaryotic cytoskeletal proteins (Mr 50,000). The $\alpha\beta$ -tubulin dimer assembles forming microtubules, and γ -tubulin is involved in microtubule organization. Microtubules are long hollow, dynamic polymers which serve to organize cellular architecture and cytoplasmic transport, by means of the microtubule associated and motor proteins which bind to their surface and travel along them. Microtubules are also the main constituent of the mitotic spindle and the target of antimitotic drugs such as colchicine and taxol. Tubulin is regulated by the binding of the gamma phosphate of GTP and a coordinated Mg^{2+} ion. GTP bound to the exchangeable site of the β subunit is hydrolyzed upon assembly, and tubulin transforms into the inactive GDP-liganded form. The only known protein which is distantly related with tubulin is the bacterial cell division protein FtsZ.

relacionada con tubulina es la proteína de división celular bacteriana FtsZ.

Estructura y función de tubulina. Para abordar la estructura-función de proteínas, utilizamos una variedad de métodos bioquímicos y biofísicos, incluyendo la primera instalación española de ultracentrifugación analítica moderna, ubicada en el CIB. Estamos desarrollando un nuevo método de modelado macromolecular, cuyo objetivo es determinar la estructura a baja resolución de macromoléculas biológicas a partir de su perfil de dispersión de rayos X en solución.

Hemos localizado 80 puntos de corte por un panel de proteasas en la superficie de tubulina, empleando anticuerpos monoclonales y microsecuenciación. La mayoría permanecen en la superficie de los microtúbulos y podrían ser zonas funcionales, mientras que aquellos cercanos a las zonas de contacto tubulina-tubulina se ocultan. Las secuencias peptídicas de superficie constituyen un conjunto de restricciones para cualquier modelo estructural a alta resolución de tubulina y microtúbulos (1).

Homología con FtsZ. Utilizando la información contenida en alineamientos múltiples de las secuencias de las tubulinas y FtsZ, hemos predicho su estructura secundaria, de forma compatible con los puntos de corte por proteasas y con CD/FTIR. Hemos detectado dos zonas predictivamente homólogas de tubulinas y FtsZ, aunque la homología de secuencia es muy restringida. La primera zona es un motivo hélice-beta-hélice-beta que incluye en sus dos primeros bucles secuencias de unión de nucleótido. Proponemos que se trata de un núcleo estructural y evolutivo de ambas familias de proteínas, que es diferente de las GTPasas típicas (FIGURA; 2). En colaboración con el grupo del Dr. Miguel Vicente (CIB), construimos GTPasas quiméricas en las que se substituyen extensas zonas de FtsZ por las correspondientes zonas de β -tubulina.

Ruta de ensamblaje de los microtúbulos inducidos por taxol. Taxol (paclitaxel) es un agente antitumoral de relevancia clínica y uno de los pocos ligandos conocidos capaces de inducir el ensamblaje de tubulina-GDP inactiva en microtúbulos. Cada dímero de tubulina ensamblado une una molécula de taxol. Utilizando dispersión de rayos X de sincrotrón con resolución temporal hemos podido detectar varios intermediarios estructurales en el ensamblaje de GDP-tubulina inducido por

Tubulin structure and function. Our preferred approaches to protein structure and function consist of a variety of biochemical and biophysical methods, including modern analytical ultracentrifugation at CIB. We are now constructing a new modelling algorithm aimed to extract the low resolution structure of biological macromolecules from their X-ray solution scattering profiles.

At the time of this report the high resolution structure of tubulin is not yet known and adequate expression systems are scarce. We have mapped 80 limited proteolysis sites at the surface of the tubulin dimer with site-directed antibodies and N-terminal microsequencing. Many of these nick sites are accessible at the functional surface microtubules, while other sites near tubulin-tubulin contacts become occluded upon assembly. The surface sequences are a set of constraints for any high resolution structural models (1).

Homology with FtsZ. Employing multiple sequence alignments of tubulins and FtsZs we have separately predicted their secondary structures. The predictions are compatible with the protease nick sites and CD and FTIR spectroscopy. Two large regions are clearly detected with the same predicted secondary structure in FtsZ and tubulin, even the sequence homology is very limited. The first region is a predicted helix-strand-helix-strand fold which contains putative nucleotide binding sequences at the first two loops. We propose that this constitutes a common structural and evolute nucleus of both families of proteins, which is different from typical GTPases (FIGURE; 2). In collaboration with Dr. Miguel Vicente's group at CIB, zones of the bacterial protein are being replaced by the predicted homologous parts from vertebrate β -tubulin, giving chimeric folded GTPases.

Pathway of assembly of taxol-induced microtubules. Taxol (paclitaxel) is a clinically relevant antitumor agent, and one of the few ligands which drive inactive GDP-tubulin into assembly. Each tubulin dimer binds one molecule of taxol in assembled microtubules. We have detected several structural intermediates of taxol- and Mg²⁺-induced tubulin assembly with time-resolved synchrotron X-ray scattering. The assembly pathway proposed (3) is compatible with the hypothesis that taxol binds at the lateral contact sites between tubulin molecules in microtubules.

Molecular probes for the taxol binding site. 7(N-fluorescein-L-alanyl)taxol is a new fluorescent probe, developed in a collabo-

Mg²⁺ y taxol. La ruta de ensamblaje propuesta (3) es compatible con la hipótesis de que taxol se une en la zona de contacto lateral entre dímeros de tubulina en los microtúbulos.

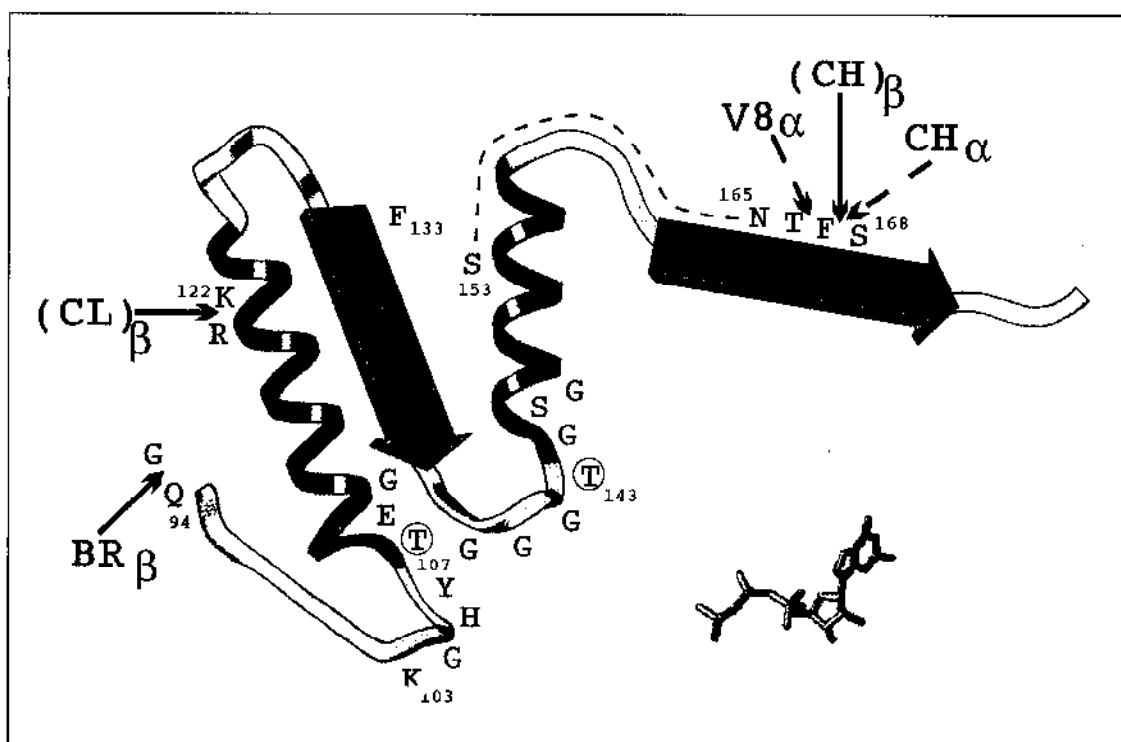
Sondas moleculares del sitio de unión de taxol. 7(N-fluorescein-L-alanil)taxol es una nueva sonda fluorescente, desarrollada en colaboración con los grupos de los Dres. Acuña (Instituto de Química Física Rocasolano), Amat-Guerri (Instituto de Química Orgánica) y Barasoain (CIB), que mantiene actividad antimitótica y permite observar directamente los microtúbulos en el microscopio de fluorescencia (4). Estamos caracterizando sus interacciones con los objetivos de i) proporcionar una nueva herramienta para estudiar los microtúbulos celulares, ii) profundizar en el mecanismo de reconocimiento molecular de taxol por los microtúbulos y iii) visualizar las dianas subcelulares de unión de taxol en las células tratadas.

ration with the groups of Drs. Acuña (Institute for Physical Chemistry) Amat-Guerri (Institute for Organic Chemistry) and Barasoain (CIB), which maintains antimitotic activity and permits direct observation of microtubules under the fluorescence microscope (4). Its interaction with microtubules is being characterized with the purposes of i) providing a new tool to study cellular microtubules, ii) understanding the mechanism of molecular recognition of taxol by microtubules and iii) visualizing the sub-cellular targets of binding in taxol-treated cells.

1 & 2) De Pereda, J.M. et al. (1996). *Biochemistry* 35, 14184-14202 & 14203-14215.

3) Diaz, J.F. et al. (1995). *Biophys. J.* 70, 2408-2420.

4) Souto, A.A. et al. (1995). *Angewandte Chem. Intl. Ed. Eng.* 34, 2710-2712.



Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGES, PB95-0116. (1996-1999).
- Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (1996-1998).
- DGICYT, APC96-0071. (1996); P394-0127 (1995-1998); P392-0007 (1993-1996).
- CSIC, Acciones Estructura y Función de Proteínas (1994-1996); Acciones integradas Hispano-Francesas. (1995-1996); Programa de Cooperación Científica con Iberoamérica. (1993-1996).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- José María de Pereda Vega. Zonas de la superficie del dímero -tubulina y de los microtúbulos: proteólisis limitada y análisis de secuencias múltiples. Univ. Complutense de Madrid, Noviembre 1995. Director: J.M. Andreu.

Publicaciones/*Publications*

- De Pereda, J.M., Wallin, M., Billger, M., and Andreu, J.M. (1995). Comparative study of the colchicine binding site and the assembly of fish and mammalian microtubule proteins. *Cell Motil. Cytoskel.* **30**, 153-163.
- Encinas, M.V., Olsen, L.R., Díaz, J.F., Andreu, J.M., Goldie, H., and Cardemil, E. (1995). Circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopic studies on the secondary structure of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1252**, 23-27.
- Monasterio, O., Andreu, J.M. and Lagos, R. (1995). Tubulin structure and function. *Comments Molec. Cell. Biophys.* **8**, 273-306.
- De Pereda, J.M., and Andreu, J.M. (1996). Mapping surface residues of the tubulin dimer and taxol-induced microtubules with limited proteolysis. *Biochemistry* **35**, 14184-14202.
- De Pereda, J.M., Leynadier, D., Evangelio, J., Chacón, P., and Andreu, J.M. (1996). Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites and homology to FtsZ. *Biochemistry* **35**, 14203-14215.
- Díaz, J.F., Andreu, J.M., Diakun, G., Towns-Andrews, E., and Bordas, J. (1996). Structural intermediates in the assembly of taxol-induced microtubules and GDP-tubulin double rings: time-resolved X-ray scattering. *Biophys. J.* **79**, 2498-2420.
- Dumortier, C., Gorbunoff, M.J., Andreu, J.M., and Engelborghs, Y. (1996). Different kinetic pathways of the binding of two biphenyl analogues to tubulin. *Biochemistry* **35**, 4387-4395.
- Dumortier, C., Gorbunoff, M.J., Andreu, J.M., and Engelborghs, Y. (1996). Alterations of rings B and C of colchicine are cumulative in overall binding to tubulin but modify each kinetic step. *Biochemistry* **35**, 15900-15906.
- Fernández, I., Ubach, J., Fuxreiter, M., Andreu, J.M., Andreu, D., and Pons, M. (1996). Conformation and self-association of a hybrid peptide of cecropin A and melittin with improved antibiotic activity. *Chemistry* **2**, 838-846.
- Pérez-Ramírez, B., Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J., and Timasheff, S.N. (1996). Stoichiometric and substoichiometric inhibition of tubulin self-assembly by colchicine analogues. *Biochemistry* **35**, 3277-3285.
- Souto, A.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., Barasoain, I., Abal, M., and Amat-Guerri, F. (1995). New fluorescent water-soluble taxol derivatives. *Angewandte Chem. Intl. Ed. Eng.* **34**, 2710-2712.

Artículos de Divulgación/*Press Articles*

- Acuña, A.U., Amat-Guerri, F., and Andreu, J.M. (1996). Taxoides fluorescentes. *Investigación y Ciencia* **240**, 58-59.

Expresión de Antígenos de Leishmania

Antigen Expression on Leishmania

ALBERTO MARQUET ESPINOSA
VICENTE LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA
Jefe de Grupo/Group Leader
Investigadores/Senior Investigators

GLORIA GONZÁLEZ ASEGUINOLAZA
RICARDO MUTUBERRÍA (IV A XII-1995)
B. Predoctorales/Graduate Students

SOLEDAD GARCÍA CALDERAT (XI-1995 A VI-1996)
Pregraduada/Undergraduate Student

Leishmania infantum es un protozoo parásito responsable de la Leishmaniasis visceral en la cuenca norte del Mediterráneo. Esta enfermedad ha tenido en los últimos años un gran incremento con la aparición de coinfecciones en enfermos inmunodeprimidos. El parásito presenta dos formas diferentes. La forma extracelular, promastigote, vive en el intestino del insecto vector. La forma intracelular, amastigote, esta presente solamente en el interior de los macrófagos del huésped mamífero infectado. La infectividad del parásito se correlaciona con variaciones en los antígenos de la superficie del parásito en su forma extracelular, la intracelular es altamente infectiva. El desarrollo de la infección depende del estado y la respuesta del sistema inmune del hospedador. Varía entre una infección asintomática, en hospedadores resistentes, hasta una infección diseminada fatal en aquellos que son sensibles. La respuesta inmune está directamente relacionada con los antígenos que presenta la célula presentadora y el tipo de respuesta que originan entre las subpoblaciones de células CD4+. En la infección experimental, los ratones sensibles que sufren una diseminación y la muerte se produce una proliferación de la subpoblación Th2. En el caso de los ratones resistentes, la subpoblación que prolifera es la Th1. Se están utilizando antígenos purificados de *L. infantum* que inducen protección en el modelo

Leishmania infantum is a parasite protozoon parasite responsible for visceral Leishmaniasis at the Northern Mediterranean basin. In the last years it has been a remarkable increase in the incidence of the disease associated with AIDS. The parasite presents two forms, one intracellular, amastigote, only present at the mammalian host macrophages and one extracellular which lives at the gut of the insect vector, the promastigote. The infectivity of the parasite correlates with surface antigen modifications. The outcome of the infection largely depends on the immune response and it may result either an asymptomatic infection, derived from a protective immunity, or a disseminated fatal disease. The immune response is related to the antigens presented by the parasite which facilitate the recognition by antigen presenting cells, and the equilibrium elicited between the CD4+ T cell subsets. Experimental infection in susceptible mice results in a disseminated lethal disease. In this case, the animal immune response to the invading parasite is a proliferation of the Th2 subset. In contrast, resistant animals show a strong Th1 proliferative response following the infection. Purified *Leishmania* antigens are used to produce recombinant live vaccines that induce protection against infection in susceptible mice.

This group has been working in the characterization and gene cloning of several antigens from *L. infantum* which have been shown to be protective against the experimental infection.

murino experimental para el desarrollo de vacunas recombinantes vivas.

El grupo de trabajo se encuentra trabajando en la caracterización de antígenos que induzcan protección en el modelo murino experimental y el clonaje de sus genes codificantes para la elaboración de vacunas recombinantes con virus *vaccinia* atenuados.

A) Se ha caracterizado el antígeno mayoritario de la superficie de *L. infantum*, una proteasa llamada gp63 y se ha clonado su gen codificante. Asimismo se han detectado variaciones en su patrón de glicosilación que se correlacionan con la infectividad del parásito.

B) Un segundo antígeno, que induce una protección muy superior ha sido caracterizado y clonado su gen codificante. Este antígeno parece un análogo del receptor de la proteína quinasa C (RACK).

C) La forma intracelular del parásito, amastigote, altamente infectiva ha sido obtenida en cultivo axénico y está siendo caracterizada.

D) En colaboración con el grupo del Prof. Esteban (CNB, Madrid) se están obteniendo virus *vaccinia* recombinantes portadores de los genes de los antígenos caracterizados como vehículos de vacunación para el modelo murino.

A) The main surface antigen named gp63, a surface protease has been characterized and cloned. Protein variations on their glycosilation pattern have been correlated with the degree of infectivity of the parasite.

B) A second antigen, which in the experimental model is highly protective named p36 has been also cloned and seems to be an analogue of the Protein Kinase C receptor (RACK).

C) The intracellular form of the parasite, amastigote, has been obtained in axenic culture and is currently been characterized.

D) The genes of the gp63 and p36 are being used to produce recombinant *vaccinia* attenuated virus as a possible vaccine for the reservoir of the disease. This work is been carried out in collaboration with the group of Prof. M. Esteban (CNB, Madrid).

Organismos Financiadores/Funding Agencies

— FIS, 94/0021-01. (1994-1996).

Tesinas de Licenciatura/Master Theses

— García Calderat. Soledad. Purificación y caracterización bioquímica de gp63 de *L. infantum* arroyo. Universidad Complutense de Madrid, 1996. Director: A. Marquet.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

— Espinosa de los Monteros, Larraga, V., and Muñoz, E. Evaluation of the public sector in biomedical research in Spain. Lessons to be learned from programs and actors. Res. Evaluation (en prensa, 1996).

— González-Aseguinolaza, G., Almazán, F., Rodríguez, F.J., Marquet, A., and Larraga, V. Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. Differential postraductional modifications correlate with different infective forms. Biochem. Biophys. Acta. (en prensa, 1996).

Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-positivas

Replication and Expression of DNA in Gram-positive Bacteria

MANUEL ESPINOSA PADRÓN

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

M^ª TERESA PÉREZ UREÑA (HASTA VII-1995)

GLORIA DEL SOLAR DONGIL
Investigadores Asociados/*Associate Researchers*

ELISABETH GROHMANN

CONCEPCIÓN NIETO MAZARRÓN
B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

PALOMA ACEBO PAIS

LEDA GUZMAN MALUENDA

ANA MARIA HERNÁNDEZ ARRIAGA

MARIA GABRIELA KRAMER XAVIER

MIRIAM MOSCOSO NAYA

DOUGLAS SELINGER (HASTA VI-1996)

B. Predoctorales/*Graduate Students*

MARÍA TERESA ALDA LÓPEZ

PEDRO VALIENTE GARCÍA (TIEMPO PARCIAL)

Personal Técnico/*Technical Staff*

I. Replicación de la hebra líder del plásmido pMV158

Este plásmido se caracteriza por: i) replica mediante círculo rodante (RCR), ii) tiene amplio rango de huéspedes, iii) es de pequeño tamaño y iv) tiene alto número de copias (N=20). La replicación se inicia por el ataque nucleofílico de la proteína iniciadora, RepB en la secuencia 5'-TACTACG/AC-3'. Este ataque está mediado por el residuo Tyr99 de RepB, ya que su cambio por Ser o Phe, abole su actividad. Tras la rotura del DNA, RepB no genera un enlace covalente estable con su DNA diana. Se han determinado varios parámetros en las reacciones de corte y cierre de RepB, usando como sustrato DNA superenrollado (dsDNA) y oligos de cadena sencilla (ssDNA). Mediante modificación de los nucleótidos situados alrededor del sitio de corte, se han comprobado los requerimientos de secuencia de la proteína. RepB reconoce los orígenes de cadena líder de plásmidos de la familia de pMV158. Se ha mapeado *in vitro* el sitio de iniciación de la replicación del plásmido pFX2 (mediado por RepX). Se han determinado, *in vivo*, los sitios de iniciación de la replicación de pMV158 y de pFX2. Asimismo, se están determinando los sitios de iniciación en otros plásmidos de interés.

I. Replication of the leading strand of pMV158.

*This plasmid, as other replicons using the rolling circle (RCR) mechanism, has these features: i) broad host range, ii) small size, and iii) high copy number (N=20). Replication initiates by the nucleophilic attack exerted by the plasmid-encoded initiator RepB protein on the sequence 5'TACTACG/AC-3'. This attack is mediated by the Tyr99 residue of RepB, since its replacement by Ser or Phe abolished RepB activity. Upon cleavage, RepB does not generate a stable covalent bond with its target DNA. We have determined various parameters involved in the nicking-closing reactions mediated by RepB, using as substrate either supercoiled DNA (dsDNA) or single stranded (ssDNA) oligos. To know the substrate requirement of RepB, the nucleotides around the nick site have been modified. RepB was able to recognize the origins of leading strand synthesis of plasmids of the pMV158 family. RCR-plasmids pMV158 and pFX2 replicate in Gram-positive bacteria and in E. coli as well. We have also mapped *in vitro* the site where leading strand replication initiates in pFX2 (mediated by RepX). In addition, the *in vivo* sites of replication initiation have been mapped in both plasmids. We are using this *in vivo* assay for other RCR-plasmids.*

II. Control de la replicación de pMV158

El control de N se ejerce sobre la síntesis de RepB y está mediado por dos productos plasmídicos: el represor transcripcional CopG y el RNA contratranscrito, ctRNA II. La formación de complejos CopG-DNA se ha estudiado usando como sustrato un oligo bicatenario de 55-mer que contiene toda la diana de CopG. Se han aislado dos mutantes espontáneos en *copG* que se traducen en plásmidos con $N \gg 20$. Se han construido cuatro mutantes en *copG* con deleciones internas dirigidas a cuatro regiones: hélices α , láminas β , y estructuras desordenadas. Se han diseñado métodos sencillos para el aislamiento de mutantes con $N > 20$. La región que codifica el ctRNA II constituye el principal determinante de incompatibilidad de pMV158. Se ha realizado mutagénesis dirigida al promotor del ctRNA II (P_{ctII}), obteniéndose un mutante que tiene $N=20$, debido a dos fenómenos coincidentes: i) disminución en la síntesis de RNA II ($N > 20$), y ii) disminución en la síntesis de RepB ($N < 20$). Además, se ha aislado y caracterizado un mutante que afecta al espaciado entre las cajas -35 y -10 del promotor P_{ctII} ($N \gg 20$).

III. Síntesis de la cadena retrasada de pMV158

La replicación de la hebra retrasada se inicia en el origen de cadena retrasada, *sso*, seguida de síntesis de DNA y la conversión de ssDNA en dsDNA. pMV158 posee dos *sso*, *ssoA* y *ssoU*. Se ha realizado la caracterización física y funcional de ambos *sso*, y definido el *ssoA* en una región de 200 pb. El *ssoU* es funcional en *S. pneumoniae* y en *B. subtilis*, mientras que el *ssoA* es solo funcional en pneumococos. Hemos comprobado que la conversión ssDNA a dsDNA está mediada por la RNA polimerasa del huésped. Dentro del *ssoA* de pMV158 hemos definido dos regiones conservadas cuyo papel de está estudiando.

IV. Movilización de pMV148: caracterización de MobM

pMV158 no es conjugativo aunque sí movilizable, pudiendo ser transferido a otros huéspedes mediante funciones suministradas por plásmidos conjugativos co-residentes. pMV158 contiene una secuencia de iniciación de transferencia de DNA (*oriT*), donde la proteína MobM introduce su corte específico. Se ha purificado MobM y se han definido los parámetros (temperatura, tiempo, cationes, concentración de proteína y DNA, etc) para optimizar la actividad de MobM sobre dsDNA de pMV158. MobM se une covalentemente al extremo 5' de su DNA diana, dejando un extremo 3'-OH libre.

II. Control of replication of pMV158.

Copy number control of pMV158 is exerted on synthesis of RepB, and is mediated by two plasmid-encoded components: the transcriptional repressor CopG and the countertranscribed RNA, ctRNA II. CopG-DNA complex formation is studied by the use of a 55 bp oligo which contains the target of CopG. Two spontaneous mutations in *copG* has been isolated, both giving plasmids with $N \gg 20$. Four mutations in *copG* have been constructed, which have internal deletions directed towards four regions in CopG: α helices, β strand and random coils. We have designed simple methods for isolation of plasmids with $N > 20$. The region encoding ctRNA II is the main incompatibility determinant of pMV158. We have performed site directed mutagenesis to the ctRNA II promoter (P_{ctII}), and have isolated a plasmid mutant with $N=20$ due to two coincidental phenomena: i) reduction in RNA II synthesis ($N > 20$), and ii) reduction in RepB synthesis ($N > 20$). We have isolated and characterized a mutation affecting the spacer between the -35 and -10 boxes of promoter P_{ctII} ($N \gg 20$).

III. Lagging strand synthesis of pMV158

Lagging strand replication initiates in the single stranded origin, *sso*, and it involves the conversion of ssDNA molecules into dsDNA forms. pMV158 has two *sso*, termed *ssoA* and *ssoU*. Both have been characterized, physically and functionally. The *ssoA* has been defined within 200 bp. The *ssoU* is functional in *S. pneumoniae* and in *B. subtilis*, whereas the *ssoA* is only functional in pneumococci. ssDNA to dsDNA conversion is mediated by the host-encoded RNA polymerase. Within the *ssoA*, we have defined two conserved regions, its role being presently studied.

IV. Mobilization of pMV158: characterization of MobM.

pMV158 is a mobilizable replicon, being transferred to other hosts by functions supplied by co-resident conjugative plasmids. pMV158 harbors a sequence involved in conjugative transfer (*oriT*), where the plasmid-encoded MobM protein introduces a specific nick. MobM protein has been purified. Parameters of MobM-cleavage of dsDNA have been defined: time, cations, temperature, protein and DNA concentration, etc. After cleavage of its target DNA, MobM remains covalently bound to the 5' end of the DNA, leaving a free 3'-OH end.

V. El sistema de maltodextrinas de *S. pneumoniae*.

Se ha purificado el regulador transcripcional MalR de *S. pneumoniae*, y se ha comenzado la caracterización de las interacciones de MalR con su DNA diana mediante retardos en gel y *footprintings*. La unión de MalR al operador para el operón *malMP* es mayor que para el operador del operón *malXCD*. MalR se une a una secuencia palindrómica que también está presente en las secuencias diana de dos represores de *E. coli*, PurR y MalI, lo que apoya la existencia de lazos evolutivos entre estas tres proteínas.

V. *S. pneumoniae* maltodextrin system

We have optimised a method for the purification of the transcriptional regulator MalR of *S. pneumoniae*. This has allowed us to carry out experiments to characterize the interactions of MalR with its target DNA by gel retardation and footprinting assays. In addition, these experiments have revealed that MalR shows a greater apparent affinity for the *malMP* operator than for the one present in the *malXCD* operon. MalR binds to a sequence palindrome which is also found in two repressor target sequences of *E. coli*, the PurR and (putative) MalI. This result supports the notion of an evolutionary link between these three proteins.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- Network UE, CHRX-CT92-0010. (1993-1995).
- CICYT, BIO94-1029. (1994-1997).
- UE, 937004-AR. (1995-1997).
- Acciones Integradas Hispano-Austriacas. (1996).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Miriam Moscoso Naya. Interacción entre la proteína RepB y el origen de replicación de pLS1. Universidad Complutense de Madrid, 1996. Director: Manuel Espinosa.

Publicaciones/Publications

- Del Solar, G., Acebo, P., and Espinosa, M. (1995). Replication control of plasmid pLS1: efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, CopG and RNA II. *Mol. Microbiol.* **18**, 913-924.
- Espinosa, M., del Solar, G., Rojo, F., and Alonso, J.C. (1995). Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**, 111-120.
- Kramer, M.G., del Solar, G., and Espinosa, M. (1995). Lagging-strand origins of the promiscuous plasmid pMV158: physical and functional characterization. *Microbiology*, **141**, 655-662.
- Moscoso, M., del Solar, G., and Espinosa, M. (1995). *In vitro* recognition of the replication origin of pLS1 and of plasmids of the pLS1 family by the RepB initiator protein. *J. Bacteriol.* **177**, 7041-7049.
- Moscoso, M., del Solar, G., and Espinosa, M. (1995). Specific nicking-closing activity of the initiator of replication protein RepB of plasmid pMV158 on supercoiled or single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **270**, 3772-3779.
- Acebo, P., Alda, M.T., Espinosa, M., and del Solar, G. (1996). Isolation and characterization of pLS1 plasmid mutants with increased copy numbers. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**, 85-91.
- Del Solar, G. y Espinosa, M. (1995). Replicación de plásmidos mediante círculo rodante. En: *Microbiología y Genética molecular* (J. Casadesús, ed). Universidad de Huelva. pp. 539-569.
- Del Solar, G., Alonso, J.C., Espinosa, M., and Diaz-Orejias, R. (1996). Broad host range plasmid replication: an open question. *Mol. Microbiol.* **21**, 661-666.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Del Solar, G., Acebo, P., and Espinosa, M. Replication control of plasmid pLS1: the antisense RNA II and the compact *malI* region are involved in translational regulation of the initiator RepB synthesis. *Mol. Microbiol.* (en prensa, 1997).
- Guzmán, L.M., and Espinosa, M. The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J. Mol. Biol.* (en prensa, 1997).

Fotobioquímica Vegetal *Plant Photobiochemistry*

PEDRO J. APARICIO ALONSO

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

MIGUEL A. QUIÑONES GÓMEZ (HASTA X-1996)

Investigador Asociado/*Associate Research*

NURIA GIRÁLDEZ (DESDE XI-1995)

FEDERICO G. WITT (HASTA VI-1995)

B. Predoctorales/*Graduate Students*

LUCAS OYA

Personal Técnico/*Technical Staff*

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

Las radiaciones de corta longitud de onda correspondientes a la luz ultravioleta y azul desempeñan en los vegetales un destacado papel como señales del medio para regular y coordinar diversos procesos metabólicos y morfogénicos. Destaca por su importancia la asimilación de los compuestos oxidados de nitrógeno, la cual precisa de estas radiaciones para su puesta en marcha.

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

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

UV- and blue-light radiation's play an important role in plants as signals from the environment in the regulation and coordination of different metabolic and morphogenesis processes. The assimilation of oxidized nitrogen compounds is particularly important since this process requires these radiations in order to take place.

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

suspensiones celulares con luz ultravioleta y/o con luz azul. Esta radiación actúa a modo de conmutador activando el sistema o sistemas de transporte de estos aniones en cuestión de segundos. Cuando esta radiación se suprime de la iluminación de la suspensión, la incorporación de estos aniones cesa a los pocos minutos.

La similitud de las características cinéticas de los transportes de NO_3^- y de Cl^- , unida al carácter competitivo de la incorporación de estos aniones, permite sugerir que este alga dispone de un único transportador para la incorporación de estos aniones.

Últimamente hemos detectado que el HCO_3^- , especie mayoritaria de carbono presente en el medio externo celular a pHs alcalinos, se incorpora activamente en un proceso dependiente de energía quimiosmótica. Una vez en el cloroplasto, el HCO_3^- se descompone en CO_2 y OH^- en una reacción acelerada por la anhidrasa carbónica. Esta incorporación de HCO_3^- está también bajo el estricto control de las luces ultravioleta y azul.

Los espectros de acción de la entrada de NO_3^- y Cl^- resultaron ser prácticamente idénticos y resultados preliminares de la incorporación de HCO_3^- sugieren que el espectro de acción de la entrada de este anión podría ser también muy similar al de los aniones citados. Estos datos permiten concluir que un mismo fotorreceptor de luz azul y ultravioleta es el encargado de modular, no solamente la asimilación del NO_3^- , sino también la asimilación de carbono. Es probable que la homeostasis de estas células también dependa en gran medida de las señales captadas por este fotorreceptor puesto que la entrada de otros aniones, como el Cl^- , también está regulada por la luz azul y/o ultravioleta.

Los resultados de otros grupos europeos permiten sugerir que es la propia nitrato reductasa (enzima que contiene unida a la membrana plasmática la que actúa como fotorreceptor. En todo caso, lo que parece razonable es que el fotorreceptor sea de naturaleza flavino-pterínica, de acuerdo con los espectros de acción mencionados, y que esté unido a la membrana teniendo en cuenta la rapidez de la respuesta a la luz. Esperamos que en el futuro estos resultados puedan contribuir a elucidar la fotorregulación del transporte de iones en células de plantas superiores.

When these radiations were suppressed, the uptake of any of these anions ceases in a few minutes.

The similarity in the kinetic characteristics of the transports of NO_3^- and Cl^- , along with the competitive nature of the uptake of these anions, suggests that the same transport system is responsible for the uptake of these two anions in this organism.

We have recently detected that HCO_3^- , the carbon compound which predominates in the external medium of cells at alkaline pHs, is taken up actively in a chemiosmotic energy dependent process. Once in the chloroplast, HCO_3^- becomes decomposed into CO_2 and OH^- in a reaction accelerated by carbonic anhydrase. This uptake of HCO_3^- is also under the strict control of UV- and blue light.

The action spectra for the uptake of NO_3^- and Cl^- were almost identical and, moreover, our preliminary results on HCO_3^- uptake suggest that the action spectrum for the uptake of this anion might also be very similar to those of NO_3^- and Cl^- . These data lead to the conclusion that the same UV- and blue light photoreceptor takes care of the modulation of the assimilation not only of NO_3^- and Cl^- but also of HCO_3^- . The homeostasis of these cells may depend to a great extent on the signals received by this photoreceptor since the uptake of other anions as Cl^- is also regulated by UV- and/or blue light.

Results from other groups suggest that the main role of plasmamembrane nitrate reductase (a flavin-pterine enzyme) would be to act as photoreceptor for NO_3^- uptake. What indeed is a fair conclusion is that the photoreceptor is of flavin-pterinic nature, according to the action spectra of NO_3^- and Cl^- uptakes and bound to the plasmomembrane, as suggested by extremely short response times (2s). We hope that, in the future, these results will contribute to the elucidation of the photoregulation of ion transport in higher plants.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies:*

- DGICYT, PB92-0497. (1993-1996).
- DGICYT, PB95-0554. (1996-1999).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- Witt, F.G. Fotorregulación de la incorporación de aniones monovalentes por el alga verde *Monoraphidium braunii*. Espectros de acción de los transportes de nitrato y cloruro. Universidad Autónoma de Madrid, 1995. Director: Pedro J. Aparicio.

Publicaciones/*Publications*

- Aparicio, P.J., Witt, F.G., Ramírez, J.M., Quiñones, M.A., and Balandín, T. (1995). Incorporación de NO_3^- , NO_2^- y Cl^- en el alga verde *Monoraphidium braunii* inducida por luz azul. En *Avances en el metabolismo del nitrógeno Inorgánico*, M. G. Guerrero, ed. (Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla), pp 79-87.
- Blasco, R., Aparicio, P.J., and Castillo, F. (1995). Photoinactivation of the detoxifying enzyme nitrophenol reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* 163, 248-253.
- Witt, F.G., and Aparicio, P.J. (1995). Characterization of the blue light-induced extracellular alkalization associated with the monovalent anion uptake by *Monoraphidium braunii*. Competition between NO_3^- and Cl^- . *Physiol. Plantarum*, 94, 545-552.
- Witt, F.G., and Aparicio, P.J. (1995). Effects of short pulses of blue light on the alkalization associated with the uptake of NO_3^- and Cl^- by the green alga *Monoraphidium braunii* and related action spectra. *Photochem. Photobiol.* 61, 619-626.
- Witt, F. G., Quiñones, M.A., and Aparicio, P.J. (1996). Photoregulation of the uptake of NO_3^- , NO_2^- and Cl^- by the green alga *Monoraphidium braunii*. In *Plant Membrane Biology*, I. M. Møller and P. Brodelius, eds. (Oxford: Clarendon Press), pp. 59-67.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- Quiñones, M.A., and Aparicio, P.J. Blue-light dependent monovalent anion transport. *Physiol. Plantarum*. (en prensa, 1977).

Interacciones Reversibles de Proteínas en Biología Molecular

Reversible Protein Interactions in Molecular Biology

GERMÁN RIVAS CABALLERO
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

MARTA BERROCAL LOBO (DESDE IX-1996)
BEGOÑA GARCÍA ALVÁREZ (DESDE IX-1996)
B. Predoctoral/*Graduate Student*

Palabras clave: Proteínas, interacciones, microtúbulos, no-idealidad, centrifugación analítica.

La mayoría de las reacciones químicas que ocurren en un sistema biológico tienen lugar en un medio que contiene una alta concentración de macromoléculas (varios cientos de mg/ml). En este ambiente la exclusión de volumen por altas concentraciones de macromoléculas presentes puede tener un enorme efecto sobre los parámetros cinéticos y en el equilibrio de reacciones macromoleculares. Nuestro interés se centra en estudiar el efecto de altas concentraciones de macromoléculas inertes sobre el ensamblaje de los microtúbulos y las interacciones del taxol con los microtúbulos. Este sistema de reconstitución constituye un modelo simplificado de la organización intracelular *in vivo*. Los microtúbulos juegan un papel central en la biología de células eucarióticas (ej., determinación de la estructura celular, motilidad celular, transporte intracelular de orgánulos, división celular). El taxol es un agente altamente citotóxico empleado en quimioterapia del cáncer, que actúa estabilizando los microtúbulos, que son su diana celular.

Keywords: Proteins, protein interactions, microtubules, macromolecular crowding, analytical centrifugation.

Within living cells, biochemical reactions take place in media containing a high concentration of macromolecules, amounting typically to several hundred mg/ml. In such "crowded" environments, the volume excluded by macromolecules to other macromolecules can have a very large effect on the equilibrium and kinetic parameters of reactions between macromolecules. Our interest focus is studying the effect of high concentrations of inert macromolecules (macromolecular crowding) on the assembly of microtubules and the interactions between taxoid drugs and microtubules. This reconstitution system constitutes a simplified model of the intracellular organization found *in vivo*. Microtubules and microtubule assembly play a central role in the biology of eukaryotic cells (i.e. in determining cell structure, cell motility, intracellular transport of organelles and cell division). Taxoid drugs (i.e. taxol) are highly cytotoxic agents, used in cancer chemotherapy, that act by stabilizing microtubules, which are their cellular target.

Ensamblaje de los microtúbulos e interacción de taxoides con microtúbulos en sistemas modelo de la organización intracelular in vivo.

Nos centramos en estudiar el efecto de altas concentraciones de macromoléculas, que no interaccionan específicamente con la tubulina pero excluyen una fracción considerable de volumen de la disolución, sobre (a) el equilibrio y cinética de polimerización de tubulina (mediante medidas de turbidez y solubilidad resueltas en el tiempo y en el equilibrio), (b) la actividad química de moléculas individuales de tubulina (por técnicas avanzadas de equilibrio de sedimentación con componentes marcados y métodos espectroscópicos); así como sobre la interacción de taxol con tubulina no ensamblada y el ligamiento de la unión de esta droga a la polimerización de tubulina. Empleamos, junto a taxol, derivados fluorescentes del mismo ya disponibles en el laboratorio así como de trazadores radioactivos. La metodología desarrollada será de aplicación general a la hora de determinar el estado de asociación y las interacciones heterólogas funcionales de proteínas relevantes en clínica o biotecnología, en medios que asemejen las condiciones existentes *in vivo*. (Proyecto en asociación con el grupo del Prof. Andreu, CIB-CSIC y con la colaboración del grupo del Dr. Allen Minton, NIH, Bethesda, USA).

Métodos avanzados de centrifugación analítica

Como grupo responsable científico del laboratorio de ultracentrifugación analítica del CIB hemos dado apoyo científico-técnico (determinación del tamaño y forma hidrodinámica aproximada de proteínas; caracterización cuantitativa de asociaciones macromoleculares de proteínas) a diversos grupos de investigación, tanto del CIB como de otros centros del CSIC, así como departamentos universitarios.

Effect of macromolecular crowding on microtubule assembly and on the interaction of taxoid drugs with microtubules

*We focus on the effect of large concentrations of inert-space filling macromolecules upon (a) the kinetics and equilibria of formation of microtubules (studied by time-dependent and equilibrium measurements of turbidity and solubility), (b) the thermodynamic activity of tubulin (studied by tracer sedimentation equilibrium, complemented with other spectroscopic techniques), as well as on the interaction of taxol with un-assembled tubulin and the linkage of taxol binding and microtubule assembly. We use, besides taxol, fluorescent derivatives of the drug available in the laboratory, as well as radioactive tracers. The developed methodology will have a broader application to determine the state of association and functional heterologous interactions of proteins, with biotechnological or clinical relevance, in a media which resembles more the *in vivo* conditions. (Project in association with Prof. Andreu's group, CIB-CSIC; and with the collaboration of Dr. Allen Minton's laboratory, NIH, Bethesda, USA).*

Advanced methods of analytical centrifugation

As the group in charge of the analytical ultracentrifugation laboratory at the CIB we have provided scientific/technical support (determination of size and approximate hydrodynamical shape of proteins; quantitative characterization of macromolecular interactions of proteins) to several research groups, from the CIB, other CSIC Institutes, as well as university departments.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- CSIC, Acción Especial por Incorporación. (1995).
- CSIC, Acción Estructura y Función de Proteínas. (1996).
- Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (1996-98).
- Proyecto DGES PB95-0120. (1996-1999).

Publicaciones/*Publications*

- Azuaga, A.I., Conejero-Lara, F., Rivas, G., De Filippis, V., Fontana, A., and Mateo, P.L. (1995). The thermodynamics of association and unfolding of the 205-316 C-terminal fragment of thermolysin. *Biochim. Biophys. Acta* 1252, 95-102.
- García de Viedma, D., Giraldo, R., Fernández-Tresguerres, M.E., Rivas, G., and Díaz-Orejas, R. (1996). A leucine-zipper motif determines different functions in a replication protein. *EMBO J.* 15, 925-934.
- Linsdell, H., Toiron, C., Bruix, M., Rivas, G., and Menéndez, M. (1996). Influence of dimerization of glycopeptide antibiotics upon the structure and thermodynamics of complex formation with cell wall model peptides. *J. Antibiot.* 49, 181-193.
- Pascual, J., Pfuhl, M., Rivas, G., Pastore, A., and Saraste, M. (1996). The spectrin repeat folds into a three-helix bundle in solution. *FEBS Lett.* 383, 201-207.
- Rivas, G., Tangemann, K., Minton, A.P., and Engel, J. (1996). Binding of fibrinogen to platelet integrin IIb3 in solution as monitored by tracer sedimentation equilibrium. *J. Mol. Recogn.* 9, 31-38.
- Usobiaga, P., Medrano, F.J., Gasset, M., García, J.L., Saiz, J.L., Rivas, G., Laynez, J., and Menéndez, M. (1996). Structural organization of LytA amidase from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 271, 6832-6838.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- Soengas, M.S., Mateo, C.R., Rivas, G., Salas, M., Acuña, A.U., and Gutiérrez, C. Structural features of 29 single-stranded DNA binding protein. II. Global conformation of N29 SSB and the effects of complex formation on the protein and the ssDNA. *J. Biol. Chem.* (en prensa, 1977).
- Toiron, C., López, J.A., Rivas, G., Andreu, D., Melero, J.A., and Bruix, M. Conformational studies of a short linear peptide corresponding to a major neutralizing epitope of a human respiratory syncytial virus fusion (F) glycoprotein. *Biopolymers* (en prensa, 1997).

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

Jefe de Departamento/*Department Head* **ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ**

Profesor de Investigación **ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ**

Investigadores Científicos **JOSÉ ANTONIO ABRISQUETA ZARRABE
ANTONIO MARTÍN GONZÁLEZ
CARLOS RODRÍGUEZ MURCIA
MATILDE SÁNCHEZ AYUSO**

Colaboradores Científicos **ÁNGELA CASADO MORAGÓN
OFELIA GARCÍA HERMIDA
GONZALO GÓMEZ ALARCÓN
MARÍA A. JAREÑO CAÑADA
ANGELES MARTÍN REQUERO
RAMÓN B. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ**

Secretaria **OLVIDO PARTEARROYO LACABA**

Fijación Directa del N₂

Direct N₂ Fixation

ANTONIO MARTÍN GONZÁLEZ
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

PILAR MARTÍN LÓPEZ (1995)
MERCEDES MORENO PAZ
TILMAN SÁNCHEZ ELSNER
B. Predoctorales/*Graduate Students*

M^a JOSÉ TOBAJAS MARTÍN
Personal Técnico/*Technical Staff*

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

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

Como 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.

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

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

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

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

We are studying growth agents with a higher activity.

Patentes/Patents

- Martín, A., and Sánchez, T. (1995). Biofertilizer and obtention procedure. Pat. N. 9500851. (International patent). Comisión UE LIFE. Creación Planta Piloto.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

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

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Pilar Martín López. Estudio de una cepa de *Bacillus subtilis* susceptible de ser utilizada como aditivo microbiológico en alimentación animal. Universidad Complutense, 1996. Directores: A. Martín González y F. Tortuero Cosialls.
- Mercedes Moreno Paz. Aislamiento, caracterización y propiedades de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* CECTh516: Estudio de sus efectos sobre el metabolismo lipídico y la flora intestinal en ratas y humanos. Universidad Complutense, 1996. Directores: A. Martín González y F. Tortuero Cosialls.

Genética Humana

Human Genetics

JOSÉ ANTONIO ABRISQUETA ZARRABE
Jefe de Grupo/Group Leader

CARLOS RODRÍGUEZ MURCIA
Investigadores/Senior Investigators

CRISTINA IGLESIAS GUIASOLA
M^ª AMPARO CERRAJERO HERNÁNDEZ
M^ª CARMEN PÉREZ LAMIGUEIRO
Personal Técnico/Technical Staff

Mecanismos genéticos responsables de anomalías del desarrollo humano

Palabras clave: Anomalías congénitas, citogenética, diagnóstico prenatal

Este estudio pretende avanzar en el conocimiento de la etiología de diferentes anomalías que suceden durante el desarrollo humano, mediante el análisis de los factores genéticos implicados en ese proceso. Nuestro trabajo cubre todo el campo del desarrollo humano. Utilizando las recientes técnicas bioquímicas y citogenéticas, la investigación se sitúa en los estadios tanto prenatal como postnatal. El análisis se realiza en colaboración con el Centro de Estudios Genéticos (Dra. M.A. Martín) de Madrid.

Genetic mechanisms responsible of abnormalities in human development

Keywords: Birth defects, cytogenetics, prenatal diagnosis.

This study aims to advance in our knowledge on the etiology of various abnormalities occurring in human development by means of the analysis of the genetic factors involved. Our current interest is to cover the whole field of human development. Using the recent biochemical and cytogenetic techniques, the analysis will be carried out at the prenatal and postnatal stages and the work will be done in collaboration with "Centro de Estudios Genéticos" (Dr. M.A. Martín) in Madrid.

Valoración ética del embrión humano

Palabras clave: Bioética, embrión humano, embriogénesis, genética del desarrollo.

La finalidad de este proyecto es la valoración ética de la realidad biológica del embrión humano a lo largo de todo el desarrollo embrionario, mediante el análisis detallado de las diferentes fases de ese proceso.

Partiendo de nuestra experiencia de 30 años dedicados al estudio genético de anomalías del desarrollo humano, se estudian los datos más recientes publicados sobre los mecanismos de regulación de la embriogénesis, destacando la base genética que subyace en ese proceso. Con esos elementos se trata de valorar, desde una vertiente ética, la realidad del embrión humano en los diferentes estadios de desarrollo.

Ethical evaluation of developing human embryo

Keywords: Bioethics, human embryo, embryogenesis, developmental genetics.

The aim of the present projects is to achieve an ethical evaluation on biological reality of human embryo through a detailed analysis of the early stages of development.

Based on our own experience of 30 years working on the field of genetic research of multiple developmental anomalies in man, we are studying the most recently published data concerning the structural changes an underlying genetic mechanisms involved in the process of embryogenesis. Keeping all this in mind the reality of human embryo during in its ethical dimension.

Publicaciones/Publications

- Abrisqueta, J.A. (1995). Aspectos biológicos del desarrollo embrionario humano. *Verdad y Vida* 209, 229-234.
- Abrisqueta, J.A. (1995). Mapa físico-patológico de los cromosomas humanos. *An. Real Acad. Farmacia* 61, 309-338.
- Abrisqueta, J.A. (1995). Bases genéticas del asesoramiento y cribado genéticos. En: Consejo genético. Aspectos biomédicos e implicaciones éticas. (Universidad de Comillas. Madrid). pp. 35-47.
- Abrisqueta, J.A. (1995). El Mapa genético humano. En: *Análisis de la Investigación en Biología Molecular*. (Cortes Generales. Madrid). pp. 120-149.
- Aller, V., Gargallo, M. y Abrisqueta, J.A. (1995). Familial transmission of a duplication-deficiency X chromosome associated with partial Turner syndrome. *Clin. Gen.* 48, 317-320.
- Abrisqueta, J.A. (1996). Genoma humano: aventura genética ante el enigma de la vida. *Cuadernos de Pensamiento*, 10, 337-345.
- Abrisqueta, J.A. (1996). Consejo genético. En: *Manual de Puericultura para Médicos de Atención Primaria*. (Sociedad Española de Puericultura. Madrid). pp. 33-44.
- Abrisqueta, J.A. (1996) Aspectos genéticos del cromosoma 21. En: *Aspectos relacionales de discapacidad: el síndrome de Down*. (Universidad de Cadiz). pp. 67-80.
- Aller, V. y Abrisqueta, J.A. (1996). Evolución del mosaicismo en el síndrome de Down. *Síndrome de Down* 13/suplemento, 13.

Artículos de Divulgación/Press Articles

- Abrisqueta, J.A. (1995). Proyecto Genoma Humano: Perspectivas y límites (I). *Tribuna Médica* 1485, 9-10.
- Abrisqueta, J.A. (1995). Proyecto Genoma Humano: Perspectivas y límites (II). *Tribuna Médica* 1486, 14-15.

Marcadores Tumorales y Procesos de Envejecimiento

Tumoral Markers and Aging Processes

ÁNGELA CASADO MORAGÓN
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigadora/*Senior Investigator*

M^a ROSARIO DE LA TORRE BINIMELIS (HASTA XII-1995)
B. Postdoctoral/*Postdoctoral fellow*

M^a ENCARNACIÓN LÓPEZ FERNÁNDEZ
Personal Técnico/*Technical Staff*

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

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

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.

Alpha-fetoprotein as a tumoral marker

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

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

Radicales libres y envejecimiento

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

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

Free radicals and aging

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

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

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- Sociedad Española de Geriátría y Gerontología.(1994-1995).
- INRCA. (1996-1999).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- Rosario de la Torre Binimelis. Determinación de la actividad de superóxido dismutasa en poblaciones humanas normales y patológicas. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Directora: A. Casado.
- Diana Carrascosa Sáez. Utilización de la Alfa Fetoproteína (AFP) en procesos tumorales de diversa etiología y otras patologías hepáticas. Universidad Complutense de Madrid, 1996. Directora: A. Casado.

Publicaciones/*Publications*

- Carrascosa, D., Casado, A., Ramírez, M.V., and Sáez, J. (1995). Valor pronóstico de la AFP en portadores crónicos del AgHBs con síndrome de Down. *Atención Primaria* 16, 296-297.
- Carrascosa, D., Casado, A., Chacón, J.I., López-Fernández, M.E., and De la Torre, R. (1995). Cáncer de mama en el varón: a propósito de un caso en edad avanzada. *Neoplasia* 12, 113.
- Casado, A., Casado, M.C., López-Fernández, M.E., and De la Torre, R. (1995). Enzyme deficiencies in neonates with jaundice. *Panminerva Méd.* 37, 175-177.

- Casado, A., de la Torre, R., López-Fernández, M.E., Carrascosa, D., Casado, M.C., and Ramírez, M.V., (1995). Superoxide dismutase and catalase blood levels in patients with malignant diseases. *Cancer Lett.* 93, 187-192.
- Casado, A., De la Torre, R., López-Fernández, M.E., Carrascosa, D., Venarucci, D., and Vallese, A. (1995). Antioxidants enzymes activities in blood samples from patients with brain tumor, *Acta Oncol.* 16, 353-359.
- Casado, A., López-Fernández, M.E., De la Torre, R., and Carrascosa, D. (1995). Talasemia y déficits enzimáticos en deficientes mentales y autistas. *Sangre* 40, 519.
- Casado, A., De la Torre, R., Cantalejo, A., Ramos, M., López-Fernández, E., and Carrascosa, D., (1995). Superoxide dismutase and other biochemical disorders in a family with Fanconi's anemia. *Panminerva Méd.* 37, 142-144.
- Venarucci, D., Catalini, P., Venarucci, V., and Casado, A. (1995). Searching for a marker for Alzheimer's disease-Apo-E. *Panminerva Med.* 37, 68-70.
- Venarucci, D., Vallese, C., Maranesi, G., Maranesi, A., Venarucci, V., and Casado, A. (1995). Determinazione sierica dell'Antigene Prostatico Specifico (PSA) come forma libera e complessata nella diagnostica della patologia prostatica. *Acta Oncol.* 16, 483-487.
- Carrascosa, D., Casado, A., De la Torre, R., and López-Fernández, M.E. (1996). Determinaciones plasmáticas de alfafetoproteína en procesos tumorales benignos. *Neoplasia* 13, 48-50.
- Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M.E., and De la Torre, R., (1996). Niveles patológicos de AFP en mieloma múltiple: a propósito de dos nuevos casos. *Oncología* 19, 251-252.
- Carrascosa, D., Casado, A., Ramírez, M.V., and Sáez, J. (1996). Valor pronóstico de alfa-fetoproteína (AFP) en cáncer hepatocelular de portadores crónicos de AgHBs y AgHBe positivos. *Atención Primaria* 18, 147-148.
- De la Torre, R., Casado, A., Carrascosa, D., and López-Fernández, M.E. (1996). Cu/Zn superoxide dismutase overproduction in mentally retarded (non-Down) patients. *Clin. Chim. Acta* 252, 205-207.
- De la Torre, R., Casado, A., López-Fernández, M.E., Carrascosa, D., Casado, M.C., Venarucci, D., and Venarucci, V. (1996). Human aging brain disorders: role of antioxidant enzymes. *Neurochem. Res.* 21, 885-888.
- De la Torre, R., Casado, A., López-Fernández, M.E., Carrascosa, D., Ramírez, V., and Sáez, J. (1996). Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia* 52, 871-873.
- Venarucci, D., Venarucci, V., Casado, A., and De la Torre, R. (1996). Placca ateromasica ed alleli delle apo E. *Minerva Cardioangiologica* 44, 15-18.

Próximos artículos/Forthcoming articles

- Carrascosa, D., Ramírez, M.V., Casado, A., de la Torre, R., López-Fernández, M.E., and Sáez, J. Prevalence and significance of HBeAg and isolated anti-HBc in several institutions for the mentally retarded in the autonomic Community of Madrid. *Am. J. Human Biol.* (en prensa, 1997).
- Carrascosa, D., Casado, A., López-Fernández, M.E., and de la Torre, R. Estudio comparativo de los niveles de AFP en pacientes con patologías malignas y benignas del sistema reproductor (masculino y femenino). *Neoplasia* (en prensa, 1997).
- Carrascosa, D., Casado, A., and López-Fernández, M.E. Determinación de AFP en pacientes con linfomas: utilidad en el control de la enfermedad tras la administración de la pauta quimioterapéutica. *Neoplasia* (en prensa, 1997).
- Casado, A., de la Torre, R., Cantalejo, A., Ramos, M., Carrascosa, D., and López-Fernández, M.E. Fanconi's anemia: report of six spanish families. *Bratislava Med. J.* (en prensa, 1997).
- Casado, A., López-Fernández, M.E., de la Torre, R., Carrascosa, D., Ramírez, V., and Sáez, J. Anormalidades hematológicas y bioquímicas en el síndrome de Down. *Diagnóst. Biol.* (en prensa, 1977).
- Venarucci, D., Venarucci, V., Battilla, L. and Casado, A. Free radicals: important cause of pathologies refer to ageing. *Panminerva Med.* (en prensa, 1997).

Metabolismo y Patología Molecular

Metabolism and Molecular Pathology

ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

Laboratorio de Genética Molecular Humana (Grupo/*Group 1*)

RAMÓN B. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Investigador/*Senior Investigator*

CONSUELO GONZÁLEZ MANCHÓN
JUAN MENAYA FERNÁNDEZ (HASTA VII-1996)
Investigadores Asociados/*Associate Researchers*

MARTA FERNÁNDEZ PINEL (HASTA VII-1996)
MILAGROS FERRER ALDEA
JIANMING TAO
B. Predoctorales/*Graduate Students*

MARÍA JOSÉ ARIAS-SALGADO ROSBY
Personal Técnico/*Technical Staff*

Laboratorio de Fisiopatología Celular (Grupo/*Group 2*)

MATILDE SÁNCHEZ AYUSO
OFELIA GARCÍA HERMIDA (DESDE 1995)
ASUNCIÓN JAREÑO CAÑADA
Investigadores/*Senior Investigators*

ELENA URCELAY GARCÍA (DESDE X-1995)
Investigadora Asociada/*Associate Research*

NORA VIVIANA BUTTA
B. Postdoctoral/*Postdoctoral Fellow*

DOLORES IBARRETA RUIZ
B. Predoctoral/*Graduate Student*

ANA MARÍA RODRÍGUEZ MONGE (HASTA VII-1996)
TOMÁS FONTELA CASADO (DESDE I-1995)
Personal Técnico/*Technical Staff*

Laboratorio de Regulación Metabólica (Grupo/*Group 3*)

ANGELES MARTÍN REQUERO
Investigadora/*Senior Investigator*

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 movilizadores de Ca^{2+} , en particular por la activación de receptores α_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 genéticas asociadas a determinados cuadros patológicos humanos y establecer una correlación precisa entre cambios estruc-

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 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,

turales 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:

- 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) Clonación y caracterización estructural y funcional de genes humanos controlables por T3.

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.*
- b) Elucidation of the molecular basis of Glanzmann's thrombasthenia.*
- c) Cloning and structural-functional characterization of human T3 responsive genes.*

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PB920291-00(02). (1993-1995).
- FIS, 93/0162. (1993-1995).
- CEE-BIOMED-1. (1993-1996).
- DGICYT, 93/0163. (1994-1996).
- DGICYT, PB94-1544. (1995-1997).
- FIS, 94/0224. (1994-1996).
- FIS, 96/2014. (1996-1999).

Publicaciones/*Publications*

- Ciprés, G., Butta, N., Urcelay, E., Parrilla, R., and Martín-Requero, A. (1995). Impaired protein kinase c activation is associated to decreased hepatic α_1 -adrenoceptor responsiveness in adrenalectomized rats. *Endocrinology* **136**, 468-475.
- Chiorini, J.A., Wendtner, C.M., Urcelay, E., Safer, B., Hallek, and Kotin, R.M. (1995). High efficiency transfer of the co-stimulatory molecules B7-2 to lymphoid cells using an improved system for packaging recombinant adeno-associated virus vectors. *Human Gene Ther.* **6** (12), 1531-1534.
- González Manchón, C., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (1995). Cloning, sequencing and functional expression of a cDNA encoding a NADP⁺-dependent malic enzyme from human liver. *Gene* **159**, 255-260.
- Ibarreta, D., Gómez-Isla, T., Portera Sánchez, A., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. (1995). Apolipoprotein ϵ phenotype in patients of Alzheimer or Parkinson disease from the spanish population. *J. Neurol. Sci.* **134**, 146-149.
- Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Martí-Palanca, H., Calduch-Giner, J.A., Rodríguez, R.B., Valdivia, M.M., and Pérez-Sánchez, J. (1995). The use of recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.* **110**, 335-340.
- Menaya J., González Manchón, C., Ayuso, M.S, and Parrilla, R. (1995). Molecular cloning, sequencing and functional expression of a human glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1262**, 91-94.
- Rivas, T., Urcelay, E., González Manchón, C., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. (1995). Role of amino acid-induced changes in ion fluxes in the regulation of hepatic protein synthesis. *J. Cell. Physiol.* **163**, 277-284.

- Salas, M., Silvestre, R.A., Garcia Hermida, O., Fontela, T., Rodríguez Gallardo, J., and Marco, J. (1995). Inhibitory effect of amylin (islet amyloid polypeptide) on insulin response to non-glucose stimuli. Study in perfused rat pancreas. *Diabetes Metabol.* *21*, 269-273.
- Urcelay, E., Butta, N., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (1995). Effect of phenylarsine oxide on the hepatic α_1 -adrenoreceptor responsiveness. Dissociation between ionotropic and metabolic responses. *Life Sci.* *57*, 1299-1307.
- Urcelay, E., Ward, P., Wiener, S.M., Safer, B., and Kotin, R.M. (1995). Asymmetric replication *in vitro* from a human sequence element is dependent on adeno-associated virus Pep protein. *J. Virol.* *69*, 2038-2046.
- Butta, N., Martín-Requero, A., Urcelay, E., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. (1996). Modulation of the hepatic α_1 -adrenoreceptor responsiveness by colchicine. Dissociation of free cytosolic Ca^{2+} -dependent and independent responses. *Br. J. Pharmacol.* *118*, 1797-1805.
- Butta, N., Martín-Requero, A., Urcelay, E., Parrilla, R., and Ayuso, M. (1996). Modulation of the hepatic α_1 -adrenoreceptor responsiveness by colchicine. In *Advances in Gene Technology: Therapeutic Strategies in Molecular Medicine*. Ahmad, F., Baumbach LL., Bernstein, P., Bialy, H., Black, S., Crooke, S., Hassler, S., Hodgson, J., Huijing, F., Whelan, W.J., eds. (Oxford: Oxford University Press).
- Chiorini, J.A., Wiener, S.M., Yang, L., Smith, R.H., Safer, B., Kilcoin, N.P., Liu, Y., Urcelay, E., and Kotin, R.M. (1996). The roles of AAV rep proteins in gene expression and targeted integration. *Current Top. Microbiol. Immunol.* *218*, 25-33.
- Ferrer, M., Fernández, M., González-Manchón, C., González, J., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (1996). A novel GPIIb mutation (Arg³⁵⁸ His) prevents surface expression of GPIIb-GPIIIa complex (integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$). Dominant negative effect of the mutant subunit. *Thromb. Hemost.* *76*, 292-301.
- Ferrer, M., Tao, J., Menaya, J., González-Manchón, C., Fernández, M., Alvarez, M.V., García-Muñoz, M., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (1996). A novel point mutation in the GPIIIa subunit of the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ associated to Glanzmann's thrombasthenia. In *Advances in Gene Technology: Therapeutic Strategies in Molecular Medicine*. Ahmad, F., Baumbach, LL., Bernstein, P., Bialy, H., Black, S., Crooke, S., Hassler, S., Hodgson, J., Huijing, F., Whelan, W.J., eds. (Oxford: Oxford University Press).
- Miyamoto, S., Chiorini, J.A., Urcelay, E., and Safer, B. (1996). Regulation of the gene-expression for translation initiation factor eIF-2a. Importance of the 3' untranslated region. *Biochem. J.* *315*, 791-798.
- Muñoz-Cueto, J.A., Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Rodríguez, R.B., and Sarasquete, C. (1996). Autoradiographic localization of growth hormone receptors in *Sparus aurata* tissues using a recombinant gilthead sea bream growth hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* *114*: 17-22.
- Silvestre, R.A., Salas, M., Rodríguez Gallardo, J., Garcia Hermida, O., Fontela, T., and Marco, J. (1996). Effect of (8-32) salmon calcitonin, an amylin antagonist, on insulin, glucagon and somatostatin release: study in the perfused pancreas of the rat. *British J. Pharmacol.* *117*, 347-350.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- González-Manchón, C., Butta, N., Menaya, J., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. Structural and functional characterization of the human cytosolic malic enzyme gene promoter. Thyroid hormone responsiveness. *DNA Cell Biol.* (en prensa, 1997).
- Ibarreta, D., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. Mutation analysis of chromosome 19 calmodulin (CALM3) gene in Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* (en prensa, 1997).
- Ibarreta, D., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. Altered Ca^{2+} homeostasis in lymphoblasts from late-onset Alzheimer's disease patients. *Alz. Dis. Assoc. Dis.* (en prensa, 1997).
- Sarasquete, C., Muñoz-Cueto, J.A., García-García, A., and Rodríguez, R.B. Histochemical and immunohistochemical aspects of the gonadotrophic cells during reproductive cycle of *Fundulus heteroclitus*. *Histochem. J.* (en prensa, 1997).
- Van Delft, J., Uttenthal, L.O., García Hermida, O., Fontela, T., and Ghiglyone, M. Identification of amidated forms of GLP-1 in rat tissues using a highly sensitive radioimmunoassay. *Regulatory Peptides* (en prensa, 1997).

Microbiología Aplicada *Applied Microbiology*

GONZALO GÓMEZ ALARCÓN
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

BEGOÑA CILLEROS MARTÍN (HASTA VII-1995)
B. Predoctoral/*Graduate Student*

JUANA M^a LORENZO VIÁN
Personal Técnico/*Technical Staff*

Palabras clave: Monumentos pétreos, bioalteración, microorganismos, contaminantes medioambientales.

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

La caracterización de los microorganismos y organismos que colonizan los materiales que componen los monumentos históricos, el estudio de sus mecanismos de alteración y la relación con otros contaminantes del medio ambiente, son objetivos de este proyecto.

El examen de costras pétreas alteradas puso de manifiesto, en muchos casos, la presencia en un mismo microhabitat de comunidades polimicrobianas constituidas por organismos autótrofos (cianobacterias y microalgas) y heterótrofos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos). Se localizaron y aislaron algas (*Apatococcus*) y bacterias (*Micrococcus*) con capacidad para formar biofilms, lo cuales se producen por la excreción de sustancias poliméricas que retienen la humedad y contaminantes orgánicos e inorgánicos que proporcionan el soporte nutritivo para el crecimiento y actividad de otros organismos. Por otro lado, los *Thiobacillus* aislados sobre sillares calizos, al oxidar compuestos reducidos de S, podrán favorecer la formación de sulfato cálcico, contribuyendo a la descomposición de los materiales.

Keywords: Stone monuments, biodeterioration, microorganisms, environmental pollutants.

Influence of the environmental pollutants on the microbial growth and on the weathering of historic monuments

The identification of microorganisms and organisms colonizing materials that form historic monuments, and their relationship with other environmental pollutants, are the objectives of this project.

*Microbial analyses of crusts of stone showed the existence of polymicrobial communities composed of autotrophic organisms (cyanobacteria and microalgae) and heterotrophs (bacteria, yeasts and filamentous fungi) in the same microhabitat. Algae (*Apatococcus*) and bacteria (*Micrococcus*) were found with the ability to create biofilms that retain moisture and pollutants acting as metabolites for the growth and activity of other microorganisms. *Thiobacillus* was isolated in limestone crusts, having been described as responsible for the transformation of calcium carbonate into gypsum and contributing to the bioalteration of those materials.*

By scanning electron microscopy (SEM), coupled with an auxiliary microanalytical system, several types of particles and

Se han analizado mediante microscopía de barrido y sonda microanalítica por dispersión de rayos X (EDS), las partículas procedentes de la contaminación atmosférica y cristales de neoformación que aparecen sobre las costras pétreas. Estos productos tienen diferente origen y aparecen con distinta morfología y composición. Los componentes mayoritarios suelen ser Al y Si, aunque también son frecuentes Ca, Na, Ti y Fe. Estas partículas actúan en ocasiones como centros de adhesión de esporas y residuos microbianos y antropogénicos y podrán, además, favorecer reacciones catalíticas.

Los análisis morfoquímicos efectuados con microscopio de barrido y microanálisis, sobre muestras alteradas, proporcionan información sobre la concentración y variedad de los elementos extraños, como P y S, o si se hallan en cantidades elevadas, tal es el caso del K, Ca y Fe, lo que indica degradación de componentes minerales.

neoformation crystals that were trapped in the mineral matrix were analysed. They were composed primarily of Al and Si, although Ca, Na and Fe were also frequently found. Carbonaceous particles operate as carriers of biological and antropogenic pollutants and could help catalytic reactions.

The morphochemical analysis performed with SEM and the microanalytical probe on weathered crusts provided information about the concentration and variety of foreign elements, such as P and S, if found in high amounts, K, Ca and Fe, indicating mineral alteration.

Organismos financiadores

- CAM, 059/92. (1992-1995).

Tesinas de Licenciatura/*Master Theses*

- Begoña Cilleros Martín. Estudio de contaminantes microbianos y antropogénicos en monumentos de Alcalá de Henares. Universidad Autónoma de Madrid, 1995. Director: G. Gómez-Alarcón

Publicaciones/*Publications*

- Gómez-Alarcón, G., Muñoz, M.L., and Flores, M. (1995). Excretion of organic acids by fungal strains isolated from decayed sandstone. *Int. Biodeter. Biodegr.* **34**, 169-180.
- Gómez-Alarcón, G., Cilleros, B., Flores, M., and Lorenzo, J. (1995). Microbial communities and alteration processes in monuments at Alcalá de Henares, Spain. *Sci. Total Environ.* **167**, 231-239.
- Gómez-Alarcón, G., Muñoz, M., Ariño, X., and Ortega-Calvo, J.J. (1995). Microbial communities in weathered sandstone: the case of Carrascosa del Campo church, Spain. *Sci. Total Environ.* **167**, 249-254.
- Gómez-Alarcón, G., Lorenzo, J., and Cilleros, B. (1995). Estudio de las causas de alteración de los sillares graníticos de la Real Academia de Farmacia. *An. Real. Acad. Farm.* **61**, 373-389.
- Gómez-Alarcón, G. (1996). Bioalteración de los monumentos históricos. En: *Degradación y Conservación del Patrimonio Arquitectónico*. F. Mingarro, ed. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, pp. 399-404.
- Gómez-Alarcón, G. (1996). Deposición de compuestos orgánicos sobre monumentos. En: *Degradación y Conservación del Patrimonio Arquitectónico*. F. Mingarro, ed. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, pp. 405-412.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- Flores, M., Lorenzo, J. and Gómez-Alarcón, G. Algae and bacteria on historic monuments at Alcalá de Henares, Spain. *Int. Biodeter. Biodegr.* (en prensa, 1997).

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA
DEPARTMENT OF IMMUNOLOGY

Jefe de Departamento
Department Head

CARMELO BERNABEU QUIRANTE (DESDE IX-1995)
SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA (HASTA XI-1995)

Investigadores Científicos

CARMELO BERNABEU QUIRANTE
ANGELES GARCÍA PARDO
SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA
JOSÉ MARÍA ROJO HERNÁNDEZ

Colaboradores Científicos

ISABEL BARASOAIN BLASCO
ANTONIO DE LA HERA MARTÍNEZ
EDUARDO PÁEZ ABRIL
AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ
JOAQUÍN TEIXIDÓ CALVO

Secretaria

ULVIDO PARTEARROYO LACABA

Activación de Linfocitos T

T-lymphocyte Activation

JOSÉ MARÍA ROJO HERNÁNDEZ
Jefe de Grupo/Group Leader
Investigador/Senior Investigator

M^a JOSÉ FEITO CASTELLANO
GABRIEL CRIADO CARRASCO
B. Predoctorales/Graduate Students

M^a LUISA DEL POZO DEL CAMPILLO
Personal Técnico/Technical Staff

Palabras clave: Linfocitos T, Th1, Th2, TCR, CD4.

Keywords: T lymphocytes, Th1, Th2, TCR, CD4.

El reconocimiento de antígeno es un punto central en la biología de los linfocitos T. Sin embargo, dependiendo de circunstancias que incluyen las características del antígeno, las señales inducidas por moléculas co-estimuladoras, o la presencia de diversas citoquinas, el reconocimiento de antígeno puede dar lugar a fenómenos muy distintos, que van del desarrollo de funciones efectoras y la expansión de linfocitos T antígeno-específicos a la inducción de apoptosis o de inactivación funcional. En nuestro grupo estamos interesados en determinar los mecanismos por los cuales las diferencias en las rutas de activación producen diferencias funcionales en los linfocitos T, y particularmente en los linfocitos T CD4⁺ como población reguladora principal. Las diferencias funcionales extremas dentro de los linfocitos T CD4⁺ se encuentran representadas por las líneas de linfocitos de tipo Th1 (que secretan IL-2, IFN- γ y TNF al ser estimuladas por antígeno) y Th2 (que secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Se sabe asimismo que el predominio de un tipo u otro de respuestas es determinante para el desarrollo de distintas enfermedades autoinmunes, resistencia a parásitos intracelulares, ó de reacciones alérgicas.

La estructura y composición de los complejos moleculares asociados al receptor para antígeno (TCR) y a distintas moléculas coestimuladoras puede influir en la orientación de la respuesta de los linfocitos T determinando, por un lado, las vías de activación que se ponen en marcha, y por otro, influyendo en la diferencia-

Antigen recognition is the keystone of T lymphocyte biology. However, depending on circumstances which include the characteristics of each antigen, signals delivered by other, costimulatory surface molecules, or the presence of certain cytokines, antigen recognition may have very different consequences for the cell, running from the development of effector functions and clonal expansion of antigen-specific T lymphocytes, to induction of apoptosis or anergy. Our group is interested in determining those mechanisms whereby differences in activation pathways lead to functional differences between T lymphocyte subpopulations, and particularly in CD4⁺ T lymphocytes as the main regulatory subset. Paradigms of these functional differences are Th1 and Th2 murine CD4⁺ T cell lines, where Th1 encompass cells secreting IL-2, -IFN and TNF upon antigen activation and Th2 cell lines secreting IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13. There is also growing evidence that a Th1- or a Th2-oriented antigen response is a prime factor for the development of certain autoimmune diseases, of effective immunity against intracellular parasites, or atopic allergy.

The structure and components of molecular complexes associated to the T cell antigen receptor (TCR) or to different costimulatory molecules may determine the orientation of T lymphocyte responses because, on one hand, of the differences in the activation pathways that are involved in each case. On the other hand, they can affect the differentiation of naive CD4⁺ T lymphocytes indu-

ción Th1-Th2 de los linfocitos T CD4⁺ no maduros. Dentro de esta problemática, actualmente seguimos diferentes líneas de trabajo para estudiar: i) El papel de los estímulos a través del TCR y de distintas moléculas co-estimuladoras en la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia patrones de secreción de linfoquinas de tipo Th1 y Th2. ii) Diferencias entre líneas de ratón Th1 y Th2 en cuanto a la asociación de enzimas (p.e. tirosina-quinasas) al TCR y a moléculas co-estimuladoras, fundamentalmente CD2 y CD4, y en las asociaciones mutuas TCR-CD4 y CD4-CD2. iii) La intervención de regiones definidas de estas moléculas en su interacción con otras proteínas y las consecuencias funcionales de estas interacciones. iv) Estudiar, en colaboración con otros grupos, la naturaleza y función de nuevas moléculas co-estimuladoras definidas mediante anticuerpos monoclonales.

cing a Th1 or Th2 polarization. Within this framework, we are currently involved in: i) Studying the role of stimuli mediated by the TCR or by costimulatory surface molecules in the differentiation of normal CD4⁺ T lymphocytes towards patterns of lymphokine secretion of Th1 or Th2 type. ii) The analysis of those differences between mouse Th1 and Th2 T cell lines in terms of enzyme association (i.e. tyrosine kinase association) to the TCR complex or to costimulatory molecules, with an emphasis in CD2 and CD4, as well as in associations between CD4 and the TCR or CD4 and CD2. iii) Determine the importance of defined regions within CD2 or CD4 for their interaction with other surface or intracellular proteins and the functional importance of these interactions. iv) Dissect, the nature and function of new costimulatory molecules detected by means monoclonal antibodies.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, SAF94-0035-CO2-01. (1994-1997).
- CAM, AE00076/95. (VII-1995/VII-1996).

Publicaciones/Publications

- Dianzani, U., Bragardo, M., Buonfiglio, D., Redoglia, V., Funaro, A., Portolés, P., Rojo, J., Malavasi, F., and Pileri, A. (1995). Modulation of CD4 lateral interaction with lymphocyte surface molecules induced by HIV-1 gp120. *Eur. J. Immunol.* 25, 1306-1311.
- Ojeda, G., Ronda, M., Ballester, S., Díez-Orejas, R., Feito, M.J., García-Albert, L., Rojo J.M., and Portolés, P. (1995). A hyperreactive variant of a CD4⁺ T cell line is activated by syngeneic antigen presenting cells in the absence of antigen. *Cell. Immunol.* 164, 265-278.
- Portolés, J.M., Ojeda, G., Ronda, M., Leza, J.C., and Rojo, J.M. (1995). Suppression of immune parameters in animal models of morphine dependence. *Immunol. Invest.* 24, 643-652.
- Rojo, J.M. (1995). Receptores y Co-receptores en la activación de linfocitos T: Aproximaciones a la modulación farmacológica de linfocitos T CD4⁺ Th1 y Th2. En *Temas de Actualidad Farmacológica, Anal. Real Acad. Farmacia.* 56 (Apéndice). (Madrid: Real Academia de Farmacia/Fundación Ramón Areces), pp. 763-789.
- Criado, G., Feito, M.J., and Rojo, J.M. (1996). CD4-dependent and -independent association of protein tyrosine kinases to the TcR/CD3 complex of CD4⁺ mouse T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26, 1228-1234.
- Redoglia V., Dianzani U., Rojo, J.M., Portolés, P., Bragardo, M., Wolff, H., Buonfiglio, D., Pileri, A., and Janeway, Jr. C.A. (1996). Characterization of H4: A murine T lymphocyte activation molecule functionally and physically associated with the CD3/TCR. *Eur. J. Immunol.* 26, 2781-2789.
- Rojo, J.M. (1996). Linfocitos T autorreactivos. En *Autoinmunidad. Algunos aspectos básicos y clínicos*, A. Portolés, ed. (Madrid: Real Academia de Farmacia), pp. 81-111.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Feito, M.J., Ballester, S., Díez-Orejas, R., Ojeda, G., Criado, G., Portolés, P., and Rojo, J.M. CD4 dependence of activation threshold and TcR signaling in mouse T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* (en prensa, 1997).

Adhesión Celular en el Sistema Inmune

Cell Adhesion in the Immune System

ÁNGELES GARCÍA PARDO

Jefe de Grupo/Group Leader

Investigadora/Senior Investigator

ISABEL ELVIRA (VIII-1995 a II-1996)

TERESA DE LA FUENTE SÁNCHEZ (DESDE VI-1996)

B. Postdoctorales/Postdoctoral Fellows

CARMEN DOMÍNGUEZ JIMÉNEZ (HASTA IV-1996)

JOSÉ VICENTE MOYANO IDOETA (DESDE III-1996)

MERCEDES GARCÍA GILA (DESDE III-1996)

B. Predoctorales/Graduate Students

MERCEDES HERNÁNDEZ DEL CERRO

Personal Técnico/Technical Staff

Palabras clave: Fibronectina, integrina $\alpha 4\beta 1$, adhesión, apoptosis, leucemia.

Interacciones de linfocitos con fibronectina

La adhesión de linfocitos al componente de matriz extracelular fibronectina, es fundamental para su migración y localización en órganos linfoides y sitios de inflamación. Además, la interacción de fibronectina con sus receptores linfocitarios, proteoglicanos e integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, induce señales intracelulares. Nuestro grupo está interesado en los eventos biológicos subsiguientes a la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con sus varios ligandos en fibronectina. Hemos demostrado previamente que $\alpha 4\beta 1$ en linfocitos reconoce constitutivamente los sitios CS-1 y el dominio Hep II, y que en estado activado, reconoce también la secuencia RGD de fibronectina. Recientemente hemos descrito que CS-1 induce reorganización de citoesqueleto, migración celular y fosforilación en tirosina de un sustrato (p110) en células B en reposo. Por el contrario, los ligandos Hep II y RGD inducen sólo adhesión celular. La activación de $\alpha 4\beta 1$ inhibe las respuestas de citoesqueleto y migratoria aunque no afecta el patrón de fosforilación. Nuestros resultados indican que las respuestas intrace-

Keywords: Fibronectin, $\alpha 4\beta 1$ integrin, adhesion, apoptosis, leukemia.

Lymphocyte interactions with fibronectin

Lymphocyte adhesion to the extracellular matrix component fibronectin, is essential to their migration and localization in lymphoid organs and inflamed tissues. Most important, binding of fibronectin to its lymphocyte receptors, proteoglycans and the $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins, induces several intracellular signals. Our group is interested in the biological events that follow the interaction of $\alpha 4\beta 1$ with its various ligands in fibronectin. We previously showed that lymphocyte $\alpha 4\beta 1$ constitutively recognizes the CS-1 site and Hep II domain, and upon activation, the RGD site in fibronectin. We have recently reported that the CS-1 ligand induces cytoskeleton reorganization, cell migration and protein tyrosine phosphorylation of a p110 substrate in resting B cells. In contrast, the Hep II and RGD ligands promote cell adhesion but no other apparent events. Activation of $\alpha 4\beta 1$ abolishes the cytoskeletal and migratory response but does not seem to affect the pattern of protein phosphorylation. Our results establish that adhesion-triggered intracellular responses in B cells, are regulated by the ligand as well as by the activation state of the $\alpha 4\beta 1$ integrin receptor.

lulares dependientes de adhesión en células B, están reguladas por el ligando y por el estado de activación del receptor $\alpha 4\beta 1$.

También estamos estudiando la función biológica de otras regiones de fibronectina, particularmente la comprendida en el dominio Hep III. Hemos encontrado que el segmento correspondiente a FN-III-4-5 y FN-III-5 promueve adhesión celular. Actualmente estamos caracterizando las secuencias de fibronectina implicadas así como los receptores celulares que reconocen esta región de la molécula. Nuestros planes futuros incluyen el estudio de otras respuestas intracelulares inducidas por adhesión a ésta y otras regiones de fibronectina.

Papel de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la apoptosis de células LLC

La leucemia linfóide crónica (LLC) es una enfermedad linfoproliferativa principalmente de células B y es la leucemia de mayor incidencia en países occidentales. Las células LLC-B circulan continuamente sin morir y por tanto constituyen un modelo importante para estudiar la apoptosis. Nuestro grupo está interesado en los mecanismos implicados en la supervivencia de células LLC-B, particularmente, en las señales generadas a través de $\alpha 4\beta 1$ después de su unión a fibronectina. Hemos encontrado que la adhesión al ligando de fibronectina de alta afinidad (CS-1) prolonga la vida de estas células en cultivo como mínimo 12 días. Actualmente estamos estudiando el papel de algunos marcadores de apoptosis como Bcl-2, p53, c-myc, en esta respuesta. Asimismo estudiaremos el efecto de factores solubles (linfocinas IL-2, 4, 6, 10), ésteres de forbol (PMA), y activación de receptores citolíticos. Por otra parte determinaremos el efecto de algunos agentes terapéuticos sobre la inducción de apoptosis en células LLC-B.

We are also studying the biological function of other regions of fibronectin, particularly that contained within the Hep III domain. We have found that the segment encompassing repeats III-4-5 and repeat III-5 promotes cell adhesion. We are currently characterizing the specific active sequences as well as the cell surface receptors that interact with this fibronectin region. Our future plans include the study of the effects of adhesion to this and other regions of fibronectin on lymphoid cell function.

Role of $\alpha 4\beta 1$ integrin in apoptosis of CLL-B cells

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disease mainly involving B cells (CLL-B), which constitutes the major type of leukemia in western countries. CLL-B cells circulate continuously in the body without dying, and therefore constitute an important model for the study of apoptosis. We are interested in the mechanisms involved in the survival of CLL-B cells, particularly in the survival signals generated via $\alpha 4\beta 1$ upon adhesion to fibronectin. We have found that adhesion to a fragment of fibronectin that contains a high affinity ligand for $\alpha 4\beta 1$, prolongs the viability of CLL-B cells in culture for at least 12 days. We are currently studying the role of some apoptosis markers such as Bcl-2, p53, c-myc, in this survival. The effect of soluble factors including lymphokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10), phorbol esters (PMA), and activation of cytolytic receptors, will also be determined. We also plan to study the effect of various therapeutic agents on the induction of apoptosis in CLL-B cells.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, SAF 94-0117. (1994-1997).
- FIS, 94-0277. (1994-1997).
- CAM, AE00063/94. (1994-1995).
- CAM, AE00413/95. (1995-1996).
- UE, Programa Biomed, BMH1-CT92-0376. (1993-1996).

Publicaciones/Publications

- Domínguez-Jiménez, C., Sánchez-Aparicio, P., Albar, J. P., and García-Pardo, A. (1996). The $\alpha 4\beta 1$ fibronectin ligands CS-1, Hep II and RGD induce different intracellular events in B lymphoid cells. Comparison with the effects of the endothelial ligand VCAM-1. *Cell Adh. Commun.* 4, 251-267.

Biología Celular de las Moléculas de Adhesión

Cell Biology of Adhesion Molecules

JOAQUÍN TEIXIDÓ

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

ANDRÉS HIDALGO

M^ª LUISA MUÑOZ

M^ª MAR ROBLEDO

FRANCISCO SANZ

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 principalmente en células hematopoyéticas y en melanomas. 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, hemos modificado determinados residuos en $\alpha 4$ mediante mutagéne-

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 and in melanoma. 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 have modified selected residues on $\alpha 4$ by site-directed mutagenesis of the $\alpha 4$ cDNA. The effects of the mutations in VLA-4 function have been analyzed by cell adhesion assays using transfected cells containing the selected mutations on $\alpha 4$. We have shown that $\alpha 4$ residues ⁸⁹Arg

sis dirigida en el cDNA de $\alpha 4$. El efecto de las mutaciones introducidas en la función de VLA-4 se ha analizado mediante ensayos de adhesión de células transfectadas con las distintas mutaciones. Hasta la fecha hemos comprobado que los residuos de $\alpha 4$ ⁸⁹Arg ⁹⁰Asp y ¹⁵²Gln son importantes en la adhesión celular a fibronectina mediada por VLA-4. 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.

Análisis del papel funcional de VLA-4 en el desarrollo del mieloma múltiple

El mieloma múltiple es un neoplasma progresivo caracterizado por la acumulación de células plasmáticas malignas en la médula ósea. Estas células proliferan en íntimo contacto con las Células estromales, y dicha proliferación es absolutamente dependiente de la presencia de IL-6 en el microambiente de la médula ósea. VLA-4 es expresada por las Células plasmáticas y media adhesiones celulares de éstas con las células estromales del mieloma. Asimismo esta adhesión se traduce en un incremento en la síntesis de IL-6 por parte de las células estromales, lo cual favorece el desarrollo del mieloma. Las células plasmáticas secretan IL-1 y TNF- α , las cuales, en combinación con IL-6, son responsables de la destrucción ósea característica de la enfermedad. VCAM-1 se expresa en la superficie de las células estromales y su síntesis puede estar regulada tanto por IL-1 como por TNF- α . Otra citoquina expresada en altos niveles en el microambiente de la médula ósea de mieloma múltiple es TGF- β . El objetivo de nuestros estudios es caracterizar con detalle las interacciones entre VLA-4 de las células plasmáticas con fibronectina y VCAM-1 de las células estromales, así como analizar como son estas interacciones reguladas por IL-1, TNF- α y TGF- β .

Caracterización estructural y funcional del sistema de receptores para TGF- β 1 en células estromales de médula ósea

La proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos depende de una estrecha relación entre éstas y las células estromales, las cuales constituyen una fuente de citoquinas y asimismo expresan diferentes receptores de citoquinas y de moléculas de adhesión necesarias para una hematopoyesis regulada. Hemos generado cultivos de células estro-

90Asp and 152Gln are important in VLA-4-mediated cell adhesion to fibronectin. These studies will show in a molecular level the interactions of VLA-4 with its ligands and will contribute to a better understanding of the processes involving VLA-4.

Analysis of functional involvement of VLA-4 in multiple myeloma

Multiple myeloma is a progressive neoplasma which is characterized by the accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow. These cells proliferate in close contact with stromal cells, and they require the presence of IL-6 in the bone marrow microenvironment. Plasma cells express VLA-4 which is involved in the adhesion of these cells with the stroma, and this interaction results in an increase of IL-6 secretion from stromal cells. The plasma cells secrete IL-1 and TNF- α , and together with IL-6 are the responsible for bone destruction which is a common feature of the disease. VCAM-1 is expressed on the surface of stromal cells, and its synthesis could be regulated by both IL-1 and TNF- α . Another cytokine expressed at high levels in the bone marrow from myeloma patients is TGF- β . The goal of our studies is to characterize VLA-4-mediated plasma cell/stroma interactions in multiple myeloma, as well as to analyze the regulation of this interaction by IL-1, TNF- α and TGF- β .

Structural and functional characterization of the TGF-1 receptor system expressed by human bone marrow stromal cells

The proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells is dependent on their close relation with bone marrow stromal cells, which constitute a source of cytokines as well as they express receptors for both cytokines and progenitor cell adhesion molecules necessary for regulated hematopoiesis. We have generated human bone marrow stromal cell cultures and analyzed the TGF- β 1 receptor components expressed by these cells. [¹²⁵I]-TGF- β 1-affinity labeling experiments showed the involvement of type I and II receptors in the specific binding of TGF- β 1. Endoglin was detected by flow cytometry on the surface of cultured marrow stromal cells, as well as in the human bone marrow stromal cell line Str-5, and it was immunoprecipitated from surface-iodinated cells. Endoglin on the stromal cells was able to bind TGF- β 1, as demonstrated by specific immunoprecipitation of [¹²⁵I]-TGF- β 1-endoglin complexes using anti-endoglin antibodies. The results presented herein provide evidence

males de médula ósea humana y analizado los componentes del sistema de receptores para TGF- β 1 expresado por estas células. Experimentos de marcaje de afinidad utilizando ó [125I]-TGF- β 1 mostraron que el tipo I y el tipo II son los principales receptores para TGF- β . Asimismo se comprobó mediante citometría de flujo e inmunoprecipitación la expresión de endoglina, la cual une también TGF- β 1 específicamente. Estos resultados demuestran que las células estromales tienen toda la maquinaria para responder eficientemente a TGF- β 1. Dada la importancia de TGF- β como regulador de la síntesis de citoquinas y receptores de citoquinas, así como de moléculas de adhesión celular, estos datos indican que la unión de esta citoquina a las células estromales puede representar un punto importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.

Estudio del papel funcional de antígenos de células estromales en la hematopoyesis

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 identificación y caracterización de las estructuras moleculares de la superficie de las células estromales que afectan la proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos es de vital importancia para una mejor comprensión de la hematopoyesis. Un procedimiento adecuado para analizar el papel funcional de antígenos de superficie de células estromales 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 del estroma. Mediante este procedimiento se han identificado previamente varias moléculas de adhesión con importancia funcional durante la hematopoyesis. En el presente estudio hemos generado un panel de anticuerpos monoclonales contra la línea estromal de ratón MS-5. En la actualidad estamos caracterizando estructural y funcionalmente los antígenos reconocidos por estos anticuerpos. 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.

that bone marrow stromal cells are fully capable of responding to TGF- β 1. Given the important role of TGF- β as a regulator of the synthesis of cytokines and cytokine receptors, as well as cell adhesion molecules, the data indicate that the binding of TGF- β 1 by stromal cells might represent an important step in the regulation of the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells.

Study of stromal antigens with functional roles in hematopoiesis

The bone marrow contains a heterogeneous mixture of stromal cells which form niches where the proliferation and differentiation of stem cells takes place. 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 identification and characterization of the stromal cell surface molecular structures which affect the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors will contribute to a better understanding of hematopoiesis. An optimal approach to analyze the role of stromal cell 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 molecules from stromal cell surfaces. This method has been before used to identify several cell adhesion molecules with functional relevance during hematopoiesis. In the present study we have generated a panel of monoclonal antibodies against the murine stromal cell line MS-5. We are now structurally and functionally characterizing the antigens recognized by these antibodies. This study will help to a better knowledge of the functional relevance of the stromal-progenitor cell interaction in the hematopoiesis.

Proyectos Financiados/Funding Agencies

- DGICYT, PB92-0494. (1993-1996).
- DGICYT, PM95-0017. (1996-1999).
- SmithKline Beecham-CDT1. (1993-1995).
- Fundación Areces. (1995-1997).

Publicaciones/Publications

- Muñoz, M., Serrador, J., Sánchez-Madrid, F., and Teixidó, J. (1996). A region of the integrin VLA α 4 subunit involved in homotypic cell aggregation and in fibronectin but not VCAM-1 binding. *J. Biol. Chem.* 271, 2696-2702.
- Pujades, C., Teixidó, J., Bazzoni, G., and Hemler, M.E. (1996). Integrin α 4 Cysteines 278 and 717 modulate VLA-4 ligand binding and also contribute to α ⁴/180 formation. *Biochem. J.* 313, 899-908.
- Robledo, M.M., Hidalgo, A., Lastres, P., Arroyo, A.G., Bernabeu, C., Sánchez-Madrid, F., and Teixidó, J. (1996). Characterization of TGF- β 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br. J. Haematol.* 93, 507-514.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Robledo, M.M., and Teixidó, J. TGF- β 1 receptors on human bone marrow stromal cells. *Leukemia and lymphoma* (en prensa, 1997).

Receptores de Membrana *Membrane Receptors*

CARMELO BERNABEU QUIRANTE
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

JUAN PEDRO LÓPEZ-BOTE
Investigador Asociado/*Associate Research*

CARLOS RIUS SOLERA (HASTA VIII-1996)
ULLA RAAB
B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

NURIA ALMENDRO MOTOS
AINHOA LETAMENDÍA URRACA
B. Predoctorales/*Graduate Students*

CARMEN LANGA POZA
Personal Técnico/*Technical Staff*

Palabras clave: Endoglina, PECAM-1, TGF- β , receptores, macrófagos.

Keywords: Endoglin, PECAM-1, TGF- β , Receptors, Macrophages.

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

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

Endoglina es un homodímero de 180 kDa capaz de unir TGF- β 1 y TGF- β 3. 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 tipo 1, lo que sugiere un importante papel para endoglina en la señalización inducida por TGF- β . La expresión de endoglina aumenta durante la diferenciación macrofágica y el propio TGF- β también estimula su expresión en monocitos humanos en cultivo y en la línea monocítica U937. Para estudiar el papel de endoglina, se han generado transfectantes estables de células U937, los cuales sobreexpresan las isoformas de L-endoglina o S-

Endoglin is a homodimer of 180kDa, which is able to bind TGF- β 1 and TGF- β 3. The gene encoding endoglin has been mapped to human chromosome 9q34qter and mutations in this locus are responsible for the disease known as Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia type 1, which suggests an important role for endoglin in the signaling induced by TGF- β . Endoglin is up-regulated during monocyte differentiation and TGF- β itself can stimulate the expression of endoglin in cultured human monocytes and in the U-937 monocytic line. To study the functional role of endoglin, stable transfectants of U-937 cells were generated which overexpress L- or S- endoglin isoforms. Inhibition of cellular proliferation and down-regulation of c-myc mRNA which are normally induced by TGF- β 1 in U-937 cells

endoglina. La inhibición de la proliferación celular y la disminución de los niveles del RNAm de c-myc, las cuales son normalmente inducidas por TGF- β 1 en células U937, no ocurrieron en los transfectantes de endoglina. La inhibición de la proliferación por TGF- β 2 no se alteró en los transfectantes, lo que está de acuerdo con la especificidad de endoglina. Otras respuestas de las células U937 al TGF- β 1, tales como la estimulación de la síntesis de fibronectina y la fosforilación y agregación homotípica de PECAM-1 fueron también inhibidas en los transfectantes de endoglina. Sin embargo, la modulación de los niveles de integrinas y PECAM-1 y la estimulación de los niveles de mRNA de TGF- β 1 y sus receptores I, II y betaglicano, ocurrieron de forma normal en los transfectantes de endoglina. En los transfectantes de L-endoglina no se observaron cambios en la unión del ligando en comparación con el control, mientras que sí se observó un aumento de 1.5 veces en los transfectantes de S-endoglina. La velocidad de degradación del ligando fue la misma en todos los transfectantes. Estos resultados demuestran por primera vez que la expresión de endoglina es capaz de modular las respuestas celulares al TGF- β .

PECAM-1 es una molécula de adhesión implicada en la migración transendotelial que es expresada por células endoteliales y hematopoyéticas. Nosotros hemos descrito previamente que TGF- β 1 regula la función de PECAM-1 incrementando su expresión y activando sus propiedades adhesivas. Para comprender los mecanismos responsables de la expresión regulada de PECAM-1, se aisló un clon genómico conteniendo 1555 bp de la región 5' flanqueante y el primer exon del gen de PECAM-1 humano. La región 5' flanqueante no tiene caja TATA consenso, pero contiene secuencias consenso para Sp1, EGR1, ets, caja-HLH, GATA, AP-2, C/EBP, YY1, CCACC, LyF-1, octámero imperfecto, heptámero caja-HMG y NF κ B, así como elementos de respuesta a ácido retinoico, glucocorticoides, fuerzas de cizalladura y fase aguda, y una secuencia Alu. Delecciones seriadas de 5' a 3', ó 3' a 5' demostraron una actividad promotora específica de tejido dentro de los dos fragmentos contiguos 0,22-kb BglII y 0,44-kb BglII/PstI. La actividad transcripcional mostrada por el fragmento 0,22-kb BglII parece ser específica del linaje mielóide, mientras que la actividad promotora del fragmento 0,44-kb BglII/PstI estaba aparentemente restringida a células endoteliales. La actividad

were abrogated in endoglin transfectants. Inhibition of proliferation by TGF- β 2 was not altered in the transfectants, in agreement with the isoform specificity of endoglin. Additional responses of U-937 cells to TGF- β 1, including stimulation of fibronectin synthesis, cellular adhesion, PECAM-1 phosphorylation and homotypic aggregation were also inhibited in the endoglin transfectants. However, modulation of integrins and PECAM-1 levels and stimulation of mRNA levels for TGF- β 1 and its receptors R-I, R-II and betaglycan occurred normally in the endoglin transfectants. No changes in ligand binding were observed in L-endoglin transfectants relative to mock, while a 1.5 fold increase was seen in S-endoglin transfectants. The degradation rate of the ligand was the same in all transfectants. These results demonstrate for the first time that endoglin is able to modulate cellular responses to TGF- β 1.

PECAM-1 is a cell adhesion molecule involved in transendothelial migration and expressed by hematopoietic and endothelial cells. We have previously reported that TGF- β 1 regulates PECAM-1 function by increasing its expression and activating its adhesive properties. To understand the mechanisms underlying the regulated expression of PECAM-1, a genomic clone containing 1555 bp of the 5'-flanking region and first exon of the human PECAM-1 gene has been isolated. The 5'-flanking region lacks a consensus TATA box, but contains consensus motifs for Sp1, EGR1, ets, HLH-box, GATA, AP-2, C/EBP, YY1, CCACC, LyF-1, imperfect octamer, heptamer, HMG-box and NF κ B, as well as shear stress-, retinoic acid-, glucocorticoid- and acute phase-responsive elements, and an Alu sequence. Successive 5' to 3', or 3' to 5' deletions revealed tissue specific promoter activity within the two contiguous 0.22-kb NheI/BglII and 0.44-kb BglII/PstI fragments. The transcriptional activity displayed by the 0.22-kb NheI/BglII fragment seemed to be specific for the myeloid lineage, whereas the promoter activity of the 0.44-kb BglII/PstI fragment was apparently restricted to endothelial cells. The transcriptional activity of the 0.22-kb NheI/BglII fragment was confirmed by 5' RACE and S1 nuclease protection experiments which revealed previously unidentified transcription start sites. The 0.22-kb NheI/BglII promoter exhibited PMA inducibility in myeloid cells and contained a PMA responsive element recognized by Sp1 and EGR-1 transcription factors. Isolation and characterization of the human PECAM-1 promoter represents an initial step in elucidating the controlled expression of the PECAM-1 gene.

transcripcional del fragmento 0,22-kb *Bgl*III fue confirmada mediante experimentos de 5' RACE y protección con nucleasa S1, los cuales demostraron nuevos sitios de iniciación de la transcripción. El promotor 0,22-kb *Bgl*III mostró inducibilidad por PMA en células mieloides y contenía un elemento de respuesta a PMA reconocido por los factores de transcripción Sp1 y EGR-1. Este aislamiento y caracterización del promotor de PECAM-1 humano representa un estadio inicial para dilucidar la expresión controlada del gen de PECAM-1.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, SAF94-0791. (1994-1997).
- SAF96-1785-E. (1996).
- EC, PL950995. (1996-1998).
- CAM, AE00419/95. (1995).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

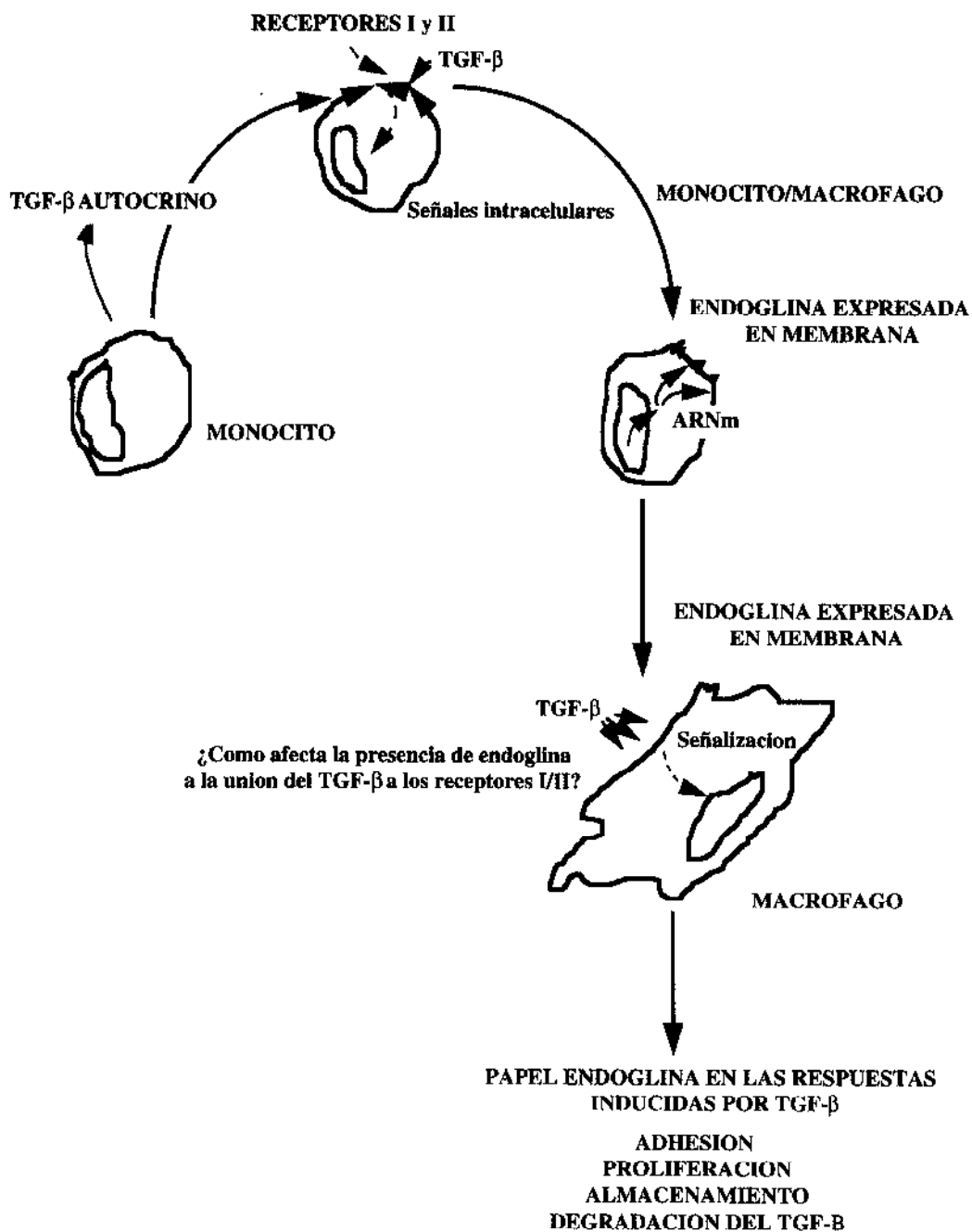
- Pedro Lastres Varo. Efectos del TGF- β en células monocíticas: Regulación funcional de las glicoproteínas PECAM-1 (CD31) y Endoglin (CD105). Universidad Complutense de Madrid. Noviembre 1995. Director: Carmelo Bernabeu Quirante.

Publicaciones/Publications

- Almendro, N., Bellón, T., Rius, C., Lastres, P., Langa, C., Corbí, A., and Bernabéu, C. (1996). Cloning of the human PECAM-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization. *J. Immunol.* **157**, 5411-5421.
- Collado, A., Pérez, B., Lastres, P., Alvarado, R., Soto, J.L., Bernabéu, C., López-Nevo, M.A., and Garrido, F. (1996). Characterization of a monoclonal antibody (GRE) that recognizes endoglin. *Inmunología* **15**, 31-35.
- Kumar, S., Wang, J.M., and Bernabéu, C. (1996). CD105 and angiogenesis. *J. Pathol.* **178**, 363-366.
- Lastres, P., Letamendía, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., López, L.A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M., and Bernabéu, C. (1996). Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J. Cell Biol.* **133**, 1109-1121.
- Robledo, M.M., Hidalgo, A., Lastres, P., Arroyo, A.G., Bernabéu, C., Sánchez-Madrid, F., and Teixidó, J. (1996). Characterization of TGF- β binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Brit. J. Haematol.* **93**, 507-514.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Corbi, A., Raab, U., and Bernabéu, C. Recirculación de células inmunitarias y sus mecanismos de localización en distintos lugares anatómicos. *Medicine* (en prensa, 1997).
- Letarte, M., Bourdeau, A., Vera, S., Pece, N., Greaves, A., Dignat-George, F., Mutin, M., Kraling, B., Linask, K., O'Brien, E., Labinaz, M., Ross, J., Parish, C., and Bernabéu, C. CD105 Workshop panel report. In *Leucocyte Typing VI* (ed. T. Kishimoto et al.) Garland Publishing Inc., New York, (en prensa, 1997).
- Raab, U., Langa, C., Letamendía, A., Lastres, P., Pérez, E., and Bernabéu, C. Characterization of anti-CD105 monoclonal antibodies using recombinant vaccinia virus. In *Leucocyte Typing VI* (ed. T. Kishimoto et al.) Garland Publishing Inc., New York, (en prensa, 1997).



Citoquinas y Apoptosis en Células Hematopoyéticas

Citokines and Apoptosis in Haematopoietic Cells

AUGUSTO SILVA

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

ANA GUTIÉRREZ DEL ARROYO VALENCIANO (DESDE IX-1996)

B. Predoctoral/*Graduate Student*

JUANA MARÍA LÓPEZ VERA

Personal Técnico/*Technical Staff*

En 1995 obtuve un ayuda para trabajar en Londres "Estancias de investigadores españoles en Centros de investigación el extranjero" Resolución D.G.I.C.Y.T. de 13, Marzo 1995 (Mayo 1995- Mayo 1996). Este año sabático lo realicé en el Laboratorio Chester Beatty, ICR, Londres, con la Dra. M. Collins, donde impulsé el estudio de la apoptosis en células hematopoyéticas, investigación que ampliaba la que se estaba llevando a cabo en el laboratorio.

I. Análisis de las señales de transducción generadas por los receptores de interleuquinas

Esta línea de investigación se detuvo en Diciembre de 1994. Los artículos asociados a esta línea de investigación son el resultado de los trabajos realizados en el laboratorio durante el periodo 1992-1994.

II. Estudio de la apoptosis de células hematopoyéticas. Papel del oncogén p53

El oncogén p53 funciona para suprimir la formación de tumores. La p53 se encuentra mutada en un gran porcentaje de tumores humanos y la predisposición a tener un cáncer está asociada a la presencia del gen p53 mutado. La presencia

In 1995, I got a fellowship from Spanish Science and Education Ministry Estancias de investigadores españoles en Centros de Investigación el extranjero Resolución DGICYT de 13, Marzo 1995 (May 1995-May 1996). This sabbatical stay was carried out in Chester Beatty Laboratories, ICR, London, in M. Collins laboratory, where I reinforced the research on apoptosis on haematopoietic cells.

I. Signal transduction generated through cytokine receptors

This line of research was stop in December 1994. The publications associated with this research corresponds to the work realised during 1992-1994 in this laboratory.

II. Apoptosis on haematopoietic cells. Role of p53 suppressor gene

The p53 protein functions to suppress tumour formation; p53 is frequently mutated in human tumours and inheritance of a mutated p53 allele predispose individuals to a variety of cancers. Mutant p53 probably acts to block the function of wild-type p53 as mice homocytously deleted for p53 show the mutant phenotype of enhanced tumour formation. Upon binding a specific DNA sequence it transactivates target genes; it also represses trans-

de p53 mutado probablemente actúa bloqueando la función del p53-salvaje, y así se comportan como variantes que carecen de la expresión de p53. El p53 actúa, al menos en parte regulando la expresión de determinados genes. La unión de p53 a regiones reguladoras de genes regulan su expresión, aunque además p53 actúa reprimiendo la maquinaria basal de transcripción.

Diversas líneas celulares dependen de factores de crecimiento específicos o citoquinas para crecer y sobrevivir. Cuando quitamos estos factores de los medios de cultivo las células se mueren con una características típicas de muerte por apoptosis. Utilizando cultivos primarios de médula ósea dependientes de la IL3 de ratones genéticamente deficientes de p53 (p53k.o.) pudimos investigar como la apoptosis inducida tras la irradiación es dependiente de la p53 y no así la muerte tras la eliminación de su factor de crecimiento.

Nuestros estudios se centran ahora en el papel del p53 en la respuesta de los tumores al tratamiento con determinados agentes genotóxicos como aquellos utilizados en quimioterapia y en la radioterapia del cáncer.

cription of genes lacking a p53 target sequence by interacting with the basal transcription machinery.

Diverse cell types in culture and in vivo are dependent upon growth factors or lymphokines for their survival. When such trophic factors are removed, cell death follows with the morphological and biochemical features of apoptosis. By using primary IL3 dependent cultures of bone marrow cells from p53-null mice and littermate controls we could demonstrate that apoptosis upon IL3 withdrawal does not require p53. Furthermore, X-irradiation induced apoptosis and its inhibition by IL3 is also dependent of p53.

Actually we are working on the role of p53 in the response of tumour cells to the treatment with genotoxic agents as some chemotherapeutic drugs and radiotherapy used against cancer.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PB93-1264.(1994-1997).

Publicaciones/*Publications*

- Gómez, J., De Aragón, A., Bonay, P., Pitton, C., García, A., Silva, A., Fresno, M., Álvarez F., and Rebollo, A.(1995). Physical association and functional relationship between protein-kinase C-zeta and the actin cytoskeleton. *Eur. J. Immunol.* *25*, 2673.
- Gómez, J., Pitton, C., García, A., Silva A., and Rebollo, A. (1995). The zeta Isoform of protein Kinase C controls Interleukin-2-mediated proliferation in a murine T cell line. *Exp. Cell Res.* *218*, 105.
- Rebollo, A., Gómez, J., Martínez de Aragón, A., Lastres, P., Silva, A., and Pérez-Salas D. (1995). Apoptosis induced by IL-2 withdrawal is associated with an intracellular acidification. *Exp. Cell Res.* *218*, 581.
- Rebollo, A., Mérida, I., Gómez, J., Pitton, C., Silva, A., Martínez, C., and García, A. (1995). 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*(3), 277.
- Rebollo, A., Pitton, C., García, A., and Silva, A. (1995). A role for the intermediate affinity IL-2R in the protection against glucocorticoid induced apoptosis. *Immunology* *84*, 388.

Próximos Artículos/*Forthcoming Articles*

- Ramírez, F., and Silva, A. Glucocorticoids enhanced ConA induced mitogenic responses through the inhibition of nitric oxide production. *Immunology* (en prensa, 1997).
- Silva, A., Willy, A., and Collins, M.K. p53 is not required for regulation of apoptosis or radioprotection by IL-3. *Blood* (en prensa, 1997).

Epítomos Funcionales de Tubulina. Mecanismos Celulares de Acción de Taxoides

Functional Epitopes of Tubulin. Cellular Mechanisms of Taxoid Action

ISABEL BARASOAIN BLASCO
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigadora/*Senior Investigator*

CONCEPCIÓN DE INÉS DÍAZ (HASTA VI-1995)
MIGUEL ABAL POSADA (DESDE V-1995)
B. Predoctorales/*Graduate Students*

Epítomos funcionales de tubulina

Las zonas de tubulina probablemente implicadas en las interacciones de formación de los microtúbulos, así como las que permanecen en su superficie accesibles a otros componentes celulares, se han explorado con un panel de anticuerpos monoclonales específicos de ocho secuencias conservadas de la molécula de $\alpha\beta$ tubulina. Para ello se ha utilizado inmunofluorescencia indirecta de células PtK2 con sus microtúbulos nativos ó fijados, ELISA de tubulina dimérica y microtúbulos ensamblados *in vitro*, e inmunomicroscopía electrónica. La secuencia (1-13) está ocluida en los microtúbulos nativos. La zona β (1-13) está ocluida en microtúbulos celulares nativos, pero expuesto en microtúbulos ensamblados *in vitro*. La mayoría de los anticuerpos específicos de la secuencia α (155-168) reaccionan con microtúbulos fijados pero no nativos, mientras que β (153-165) muestra variabilidad en su grado de exposición. Las secuencias α (214-226) y β (241-256) se encuentran ocluidas en microtúbulos mientras que las zonas α (430-443) y β (412-431) se encuentran expuestas en su superficie.

Mecanismos celulares de acción de taxoides. Sondas fluorescentes

El Taxol (paclitaxel) y su análogo semisintético docetaxel son dos agentes anticancerosos utilizados en clínica, efectivos en tumores resistentes, que promueven el ensamblaje de tubulina y estabilizan los microtúbulos celulares. Se ha corre-

Functional epitopes of tubulin

With a panel of monoclonal antibodies specific of eight conserved sequences of $\alpha\beta$ tubulin we have explored which regions of tubulin could be involved in interactions leading to microtubule formation and those that remain at their surface accessible to other cellular components. For this purpose, indirect immunofluorescence of PtK2 native or fixed cytoskeletons, dimeric tubulin and *in vitro* polymerized microtubules ELISA and immunoelectronmicroscopy have been used. The α (1-13) sequence is occluded in native microtubules. The β (1-13) region is occluded in native cellular microtubules but is exposed in *in vitro* assembled microtubules. Most of α (155-168) sequence specific antibodies react with fixed but not native microtubules while the β (153-165) region shows variability in the degree of exposure. The α (214-226) and β (241-256) sequences are occluded in microtubules while the α (430-443) and β (412-431) regions are exposed at their surface.

Cellular mechanisms of taxoid action. Fluorescent probes

Taxol (paclitaxel) and its semisynthetic analogue docetaxel are two clinically important anticancer agents, which are effective in resistant tumours, that promote tubulin assembly and stabilize cellular microtubules. The appearance of characteristic cellular lesions such as microtubule bundles and multiple asters has been correlated to an increase of polymerised cellular tubu-

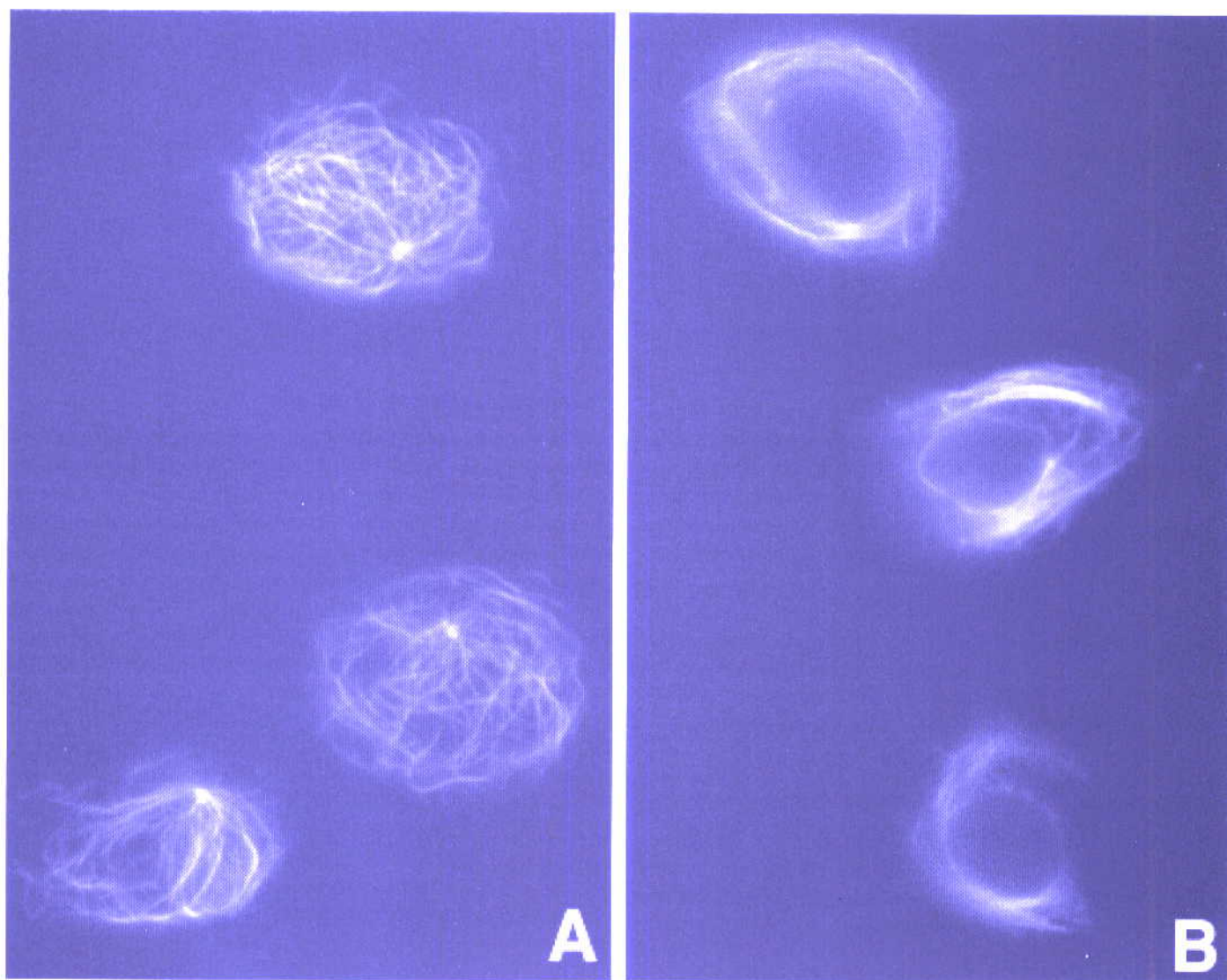


Figura: Microtubulos de células de leucemia monoclonal U937 visualizados con 37 nM 7-(N-fluorescein-L-alanyl) taxol (Flutax) (panel A). Células tratadas con 250 nM Flutax que induce la formación de haces de microtubulos (panel B).

Figure: Microtubules of U937 monocytic leukemia cells visualized with 37 nM 7-(N-fluorescein-L-alanyl) taxol (Flutax) (panel A). Induction of microtubule bundles per cells treated with 250 nM Flutax (panel B).

lacionado la aparición de lesiones celulares características, consistentes en haces de microtúbulos y asteres múltiples, con el aumento en el contenido de tubulina celular polimerizada. Ambos fármacos bloquean la proliferación celular de PtK2, U937, K562 y HL60 e inducen apoptosis en alguna de estas líneas celulares. Las líneas celulares leucémicas concentran estos compuestos intracelularmente en condiciones en las que se obtiene bloqueo del ciclo celular. Se ha caracterizado la unión ^3H -Taxol y ^{14}C -docetaxel a sus dianas celulares. Ambas drogas parecen competir por el mismo sitio de unión, siendo la afinidad de unión de docetaxel aproximadamente el doble que la de Taxol.

Empleando derivados fluorescentes de Taxol estudiamos, mediante visualización directa por microscopía de epifluorescencia, su unión a los microtúbulos citoplásmicos y a husos mitóticos (Figura), así como la aparición de los haces de microtúbulos y ásteres. Nos proponemos determinar la diana celular primaria que se marca a las concentraciones más bajas que inhiben la división y se desencadenan la muerte celular.

lin content. PtK2, U937, K562 and HL60 cell proliferation was blocked by both compounds and apoptosis was induced in some of these cell lines which accumulated taxoids intracellularly. The binding of ^{14}C -docetaxel and ^3H -Taxol to its cellular target has been characterised. Both drugs compete for the same microtubule binding site, docetaxel having nearly double binding affinity. Intracellular concentrations of these drugs occurred in the leukemic cells.

The binding of fluorescent Taxol derivatives to cytoplasmic microtubules, to mitotic spindles (Figure), as well as the appearance of microtubule bundles and asters is directly visualised by epifluorescence microscopy. We intend to determine the primary target which binds at the low concentrations that inhibit cell division and trigger cell death.

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- DGICYT, PM92-0003. (1993-1995).
- DGICYT, PB92-0007. (1993-1996).
- DGICYT, PB95-0116. (1996-1999).
- DGICYT, PB95-0078-C02-01. (1996-1999).
- Fundación Científica de la Sociedad Española contra el Cáncer (1996-1998).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- Concepción de Inés Díaz. Interacción de microtubulos celulares con anticuerpos específicos y con nuevos compuestos antitumorales. Universidad Autonoma de Madrid, 1995. Directora: I. Barasoain Blasco.

Publicaciones/*Publications*

- Alonso, M.T., Mollinedo, F., Barasoain, I., Álvarez, J., and García-Sancho, J. (1996). Transient inhibition of capacitative calcium entry in human neutrophils by a monoclonal antibody directed against a 19-kDa antigen. *J. Leukoc. Biol.* 60, 323-327.
- Domenech, J., Barasoain, I., Prieto, A., Gómez-Miranda, B., Bemabé, M., and Leal, J.A. (1996). An antigenic water-soluble glucogalactomannan extracted from the cell walls of *Paecilomyces fumosoroseus* y *Paecilomyces farinosus*. *Microbiology* 142, 3497-3503.
- Souto, A.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., Barasoain, I., Abal, M., and Amat-Guerri, F. (1996). New fluorescent water-soluble Taxol derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 2710-2712.

Proximas Publicaciones/*Forthcoming Articles*

- Mollinedo, F., Fontán, G., Barasoain, I., and Lazo, P. Recurrent infections in CD53 deficiency. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (en prensa, 1997).

Diferenciación de Linfocitos Humanos

Receptors Driving Human Lymphocyte Development

ANTONIO DE LA HERA

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

EVA SANZ

Investigadora Asociada/*Associate Research*

WINSTON ANDRADE

ERNESTO DONCEL (1996)

GEMMA FERNÁNDEZ-MIGUEL

ALICIA SANTOS (1995)

B. Predoctorales/*Graduate Students*

Parte del trabajo aquí referido se realizó en Proyectos Coordinados con los Doctores Álvarez de Mon (UA) e Iglesias (Max Plank Institut für Immunopsiquiatrie, Munich), y en colaboraciones con los Doctores Melchers (Institute for Immunology, Basilea), Alarcón (CBM-CSIC) y Kappes (Fox Chase Cancer Institute, Filadelfia). Se ha realizado una colaboración intramural con la Dra. Goday (CIB-Biología Celular y del Desarrollo), cuyo contenido se recoge en su Memoria.

El objetivo central de nuestro laboratorio es el estudio de los mecanismos que regulan la proliferación y selección clonal del linaje linfoide humano, con énfasis en los receptores clonales para antígeno y sus pre-receptores, usando herramientas de biología celular y molecular y genética moderna tanto *in vitro* como en modelos animales.

Los receptores clonales de los linfocitos T como B (TCR/CD3, BCR/CD79) requieren el ensamblaje intracelular de múltiples subunidades antes de que el "complejo receptor" sea transportado a la superficie celular y pueda transducir señales en linfocitos totalmente diferenciados. Sin embargo, tanto los precursores de los linfocitos T como B expresan en su superficie complejos receptores "incompletos" antes de que el juego completo de subunidades este disponible. Esta discrepancia se explica por la expresión en este estadio del desarrollo de cadenas suplantadoras de las cadenas de unión a antígeno,

This work was partially done as Coordinated Projects with Dr. Álvarez de Mon (UA) and Iglesias (Max Plank Institut für Immunopsiquiatrie, Munich), and in collaboration with Drs. Melchers (Basel Institute for Immunology), Alarcón (CBM-CSIC) and Kappes (Fox Chase Cancer Institute, Philadelphia). We also carried out intramural research together with Dr. Goday (Dpt. of Cellular and Developmental Biology-CIB), which is well described in her team report.

*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 their pre-receptors, and using cellular and molecular biology as well as modern genetic tools either *in vitro* or in animal models.*

Both T and B cell receptors (TCR/CD3, BCR/CD79) are compound receptors that require the intracellular assembly of complete sets of subunits prior to their transport to the cell surface and become competent for signaling in fully differentiated lymphocytes. However, both T and B cell progenitors express on their surface parts of their mature receptors complexes prior to the availability of the full set of subunits. This discrepancy can be reconciliated by the developmentally controlled expression of surrogate subunits, like VpreB, in lymphocyte progenitors. It is also controversial whether the parallel transduction modules,

como VpreB en células progenitoras de linfocitos B. También es motivo de controversia si los módulos paralelos de transducción de señales de estos receptores, como CD3 $\epsilon\gamma$ y CD3 $\epsilon\delta$ en células T, tienen diferente organización/función en precursores linfocitarios y células maduras. Estos pre-receptores juegan un papel clave en el control del desarrollo de los linfocitos, motivo por el que hemos centrado nuestros esfuerzos en este último bienio en su caracterización.

Para estudiar la distribución y estructura de los pre-receptores del linaje B, hemos producido y purificado una subunidad componente del suplantador de la cadena ligera de inmunoglobulina (ψ L), llamada VpreB. Se ha seleccionado un panel de anticuerpos monoclonales de ratón específicos frente a VpreB humano recombinante que reconocen distintos epítomos que se expresan diferencialmente en progenitores muy tempranos -proB- o precursores más tardíos -preB-. La disponibilidad de anticuerpos que reconocen pre-receptores en células proB, propuesta en ratón pero hasta ahora negados en nuestra especie, ha permitido su caracterización molecular preliminar en humanos. La posibilidad de identificar, cuantificar y separar progenitores muy tempranos de células B humanas según la expresión de pre-receptores ha permitido definir los estadios de desarrollo de los linfocitos B humanos. Para ello se ha analizado -y comparativamente con del estado de reordenamiento y expresión de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina- la expresión de receptores relevantes en la diferenciación hemopoiética, de la maquinaria de generación de diversidad del BCR/CD79 y de las cadenas suplantadoras de las inmunoglobulinas; además del tamaño y posición en el ciclo celular, indicativos de su actividad proliferativa. Los resultados de este estudio multiparamétrico realizado al nivel de células individuales ha permitido cartografiar con gran precisión el mapa de desarrollo de las células B humanas, lo que tendrá valor para entender y tratar procesos de inmunodeficiencia, linfoproliferación, autoinmunidad y otras enfermedades cuya patogenia pudiese debutar en los puntos de control del desarrollo linfocitario.

Como parte de nuestra estrategia para caracterizar la organización y función de los módulos de transducción paralela en la diferenciación del linaje T se introdujo el gen CD3 δ humano en ratones deficientes en el gen homólogo, creados por mutagénesis dirigida.

such as CD3 $\epsilon\gamma$ and CD3 $\epsilon\delta$ in T cells, have different arrangement/functions in progenitors and mature lymphocytes. We have centered much of our efforts in the past two years in the characterization of such pre-receptors, considering that pre-receptors play a critical role at the developmental checkpoints along T and B lymphocyte ontogeny.

To study the distribution and structure of B lineage pre-receptors, we produced and purified a subunit of the surrogate light chain (ψ L), termed VpreB. A panel of mouse monoclonal antibodies were created that discriminate distinct epitopes which are available on VpreB as expressed either on proB or preB cells, and not just on preB cells as reported before. A preliminary characterization of the pre-receptors expressed on the surface of human proB cells was carried out using those novel tools. The antibodies also made it feasible to enumerate, sort and characterize distinct precursors in the human B lineage developmental pathway. To this aim analyses of the rearrangement and expression of immunoglobulin heavy and light chain loci were applied in parallel with the study of the expression of differentiation antigens, BCR/CD79 recombination and diversification machinery, and VpreB surrogate chain were done. Measurements of the cell size and position in the cell cycle, indicative of the cell proliferative status were also carried out. The results of such multiparametric study performed at the single-cell level allow to order the human B cell development in well-defined stages. This fundamental knowledge may be valuable to understand the pathogeny and improve the treatment of immunodeficiency, lymphoproliferative and autoimmune diseases, as well as other clinical syndromes reflecting abnormal selection at developmental check points.

As part of our program to learn about the organization/function of the CD3 parallel transduction modules in the T cell lineage development, a human CD3 δ transgene was introduced into mice deficient in the homologue gene by homologous recombination (KO).

Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- CICYT, SAF 93/0925-CO2-01. (1993-1995).
- FISS, 94/0026-CO2-02. (1994-1995).
- CICYT, BIO 95-2063-E. (1996).
- CICYT, SAF 96/0201-CO2-02. (1996-1998).

Tesis Doctorales/*Doctoral Theses*

- Flavio Carrión Arrigada. La leucemia crónica de células B como modelo de estudio de la activación de linfocitos B humanos. Universidad de Alcalá, 1996. Directores: A. de la Hera y M. Álvarez de Mon.

Publicaciones/*Publications*

- Álvarez de Mon, M., and de la Hera, A. (1995). Implicaciones patogénicas del sistema inmunitario. En *Patología General*, (McGraw-Hill), pp. 177-184.
- De la Hera, A., and Álvarez de Mon, M. (1995). Bases celulares y moleculares de la patología del Sistema Inmunitario. En *Patología General*, (McGraw-Hill), pp. 153-175.
- Ghia, P., Ten Boekel, E., Sanz, E., de la Hera, A., Rolink, A.G., and Melchers, F. (1996). Ordering of human bone marrow B-lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J. Exp. Med.* 184, 2217-2229.
- Román, I., Manzano, L., de la Hera, A., L. Abreu, Rossi, Y., and Álvarez de Mon, M. (1996). Expanded CD4⁺CD45RO⁺ phenotype and defective proliferative response in T-lymphocytes from Crohn's disease patients. *Gastroenterology* 110, 1008-1019.
- Sanz, E., and de la Hera, A. (1996). A novel anti-Vpre-B antibody identifies immunoglobulin-surrogate receptors on the surface of human pro-B cells. *J. Exp. Med.* 183, 2693-2698.

Próximos Artículos/*Forthcoming Papers*

- Dave, V., Cao, Z.-S., Browne, C., Alarcon, B., Fernández-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S., and Kappes, D.J. (1997). CD3 δ deficiency arrests development of the $\alpha\beta$ but not the $\gamma\delta$ T cell lineage. *EMBO J.* 16, 1360-1370.

Genética del Complemento/Patología Molecular

Complement Genetics/Molecular Pathology

SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA

Jefe de Grupo/Group Leader

Investigador/Senior Investigator

PILAR SÁNCHEZ-CORRAL

BEGOÑA GRANADINO (DESDE VI-1996)

Investigadoras Asociadas/Associate Researchers

DAMIAN HEINE SUÑER

PIETRO ACCARDO (1995)

B. Postdoctorales/Postdoctoral Fellows

NATALIA ARENZANA ARIAS (HASTA X-1995)

DANIEL BELTRAN VALERO DE BERNABÉ (DESDE X-1996)

OLGA CRIADO GARCÍA

MIGUEL ÁNGEL DÍAZ GUILLÉN

B. Predoctorales/Graduate Students

M^º SOLEDAD VARA DE REY

Personal Técnico/Technical Staff

Nuestro laboratorio mantiene desde 1983 una línea de Investigación centrada en el estudio funcional y genético de proteínas reguladoras del sistema del complemento (I). Además, desde 1995 ha iniciado dos líneas de Investigación en genética molecular humana (II y III).

I. El complemento es el mecanismo efector humoral más importante de la defensa natural o inespecífica, y está diseñado para defendernos de la infección generando componentes activos capaces de lisar los microorganismos o de revelar su presencia al sistema inmune celular. Su correcto funcionamiento requiere de reguladores de su actividad y de receptores para sus componentes activos en células del sistema inmune. La mayoría de estos componentes reguladores y receptores pertenecen a la misma familia de proteínas. Sus genes están estrechamente ligados en un agrupamiento genético

Since 1983, research in our laboratory has been focused on the study of the genetics and function of the proteins that regulate the complement system (I). In addition, during 1995 we have started working on two new research projects within the field of human molecular genetics (II and III).

I. Complement is a major defense and clearance system in the bloodstream that is designed to fight infection by generating active elements that will have the potential of killing microorganisms or marking their presence to the cellular immune system. To function correctly the complement requires molecules regulating its activity and receptors for its active elements on immune system cells. The majority of these regulators and receptors belong to the same family of proteins and are coded by closely-linked genes within the RCA gene cluster, located on the long arm of chromosome 1 (1q32). Aspects of RCA biology being studied in

localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q32) y que denominamos sistema RCA. Los aspectos de la biología del sistema RCA que se estudian actualmente en nuestro laboratorio incluyen: i) Cartografía genética, incluyendo el clonaje y la secuenciación del sistema RCA humano y la caracterización de nuevos genes en esta región cromosómica; ii) Estudios comparativos y análisis de la evolución molecular del sistema RCA; iii) Caracterización de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de algunos de los genes del sistema RCA; y iv) Interacción de proteínas reguladoras del complemento con patógenos microbianos (En colaboración con el Dr. E. García, CIB).

II. El análisis genético de la región 1q32, donde se ubica el sistema RCA, tiene gran interés fuera del ámbito de la Inmunología. Nuestro laboratorio dispone de mapas genéticos y físicos detallados de esta región y ha iniciado una línea de Investigación en colaboración con el Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz que pretende determinar si existen en esta región, genes supresores de tumores. Esta hipótesis se apoya en datos de varios laboratorios, incluyendo el nuestro, indicando la existencia de al menos una zona en 1q32 con pérdida de heterocigosidad en tumores de mama.

III. Desde 1995 una parte importante de los recursos de nuestro laboratorio se han dedicado al estudio de las bases moleculares de la alcaptonuria (AKU; McKusick 203500), una patología hereditaria en la que la deficiencia de una enzima del catabolismo de la tirosina (HGO) causa la acumulación de ácido homogentísico. En colaboración con el grupo del Dr. M. A. Peñalva en el CIB., hemos clonado y caracterizado el gen humano responsable de la alcaptonuria. En la actualidad estamos estudiando los mecanismos que regulan la expresión del gen HGO y caracterizando mutaciones en este gen en pacientes AKU de distintas poblaciones y grupos étnicos.

our laboratory include: i) Genetic mapping of the RCA gene cluster. This includes cloning, sequencing and characterization of new genes within the RCA; ii) Comparative studies and molecular evolution of the RCA gene cluster; iii) Characterization of the molecular mechanisms that regulate the expression of some of the RCA genes; and iv) Interaction of proteins that regulate complement with microbial pathogens (In collaboration with Dr. E. García, CIB).

II. The genetic analysis of the 1q32 region in which the RCA gene cluster is found, is of great interest to other fields besides Immunology. Our laboratory has constructed detailed physical and genetic maps of 1q32 that have been an incentive for a collaborative research project with the Servicio de Genética of the Fundación Jiménez Díaz to determine the presence and positional cloning of tumor suppressor genes within this region. This hypothesis is based on data of various laboratories, including ours, that suggest there is within 1q32 a region of allelic imbalance in mammary tumours.

III. Since 1995, an important part of the resources of our laboratory have been dedicated to the study of the molecular basis of alkaptonuria (AKU; McKusick 203500). Alkaptonuria is a hereditary disease that is caused by the accumulation of homogentisic acid due to the deficiency of an enzyme involved in the catabolism of tyrosine (HGO). In collaboration with the group of Dr. M. A. Peñalva of the CIB, we have cloned and characterized the human gene that causes alkaptonuria. In the present, we are studying the mechanisms that regulate the expression of the HGO gene and characterizing mutations within this gene in AKU patients of different populations and ethnic backgrounds.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CAM, AE00035/94. (1995).
- Fundación José Antonio de Castro. (1996).
- FIS, 95/0885. (1995-1997).
- CAM, AE00360/95. (1996).
- CICYT, SAF-96/0055. (1996-1999).
- UE (Biomed-2), BMH4-CT96-1005. (1996-1999).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Natalia Arenzana Arias. Caracterización de las regiones promotoras de los genes *C4BPA* y *C4BPB*. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Director: Santiago Rodríguez de Córdoba.

Publicaciones/Publications

- Arenzana, N., Rodríguez de Córdoba, S., and Rey-Campos, J. (1995). The expression of the human gene coding for the α -chain of C4b-binding protein, *C4BPA*, is controlled by a HNF1-dependent hepatic-specific promoter. *Biochem. J.* 308, 613-621.
- Criado, O., Sánchez-Corral, P., and Rodríguez de Córdoba, S. (1995). Isoforms of Human C4b-binding Protein. II. Differential modulation of the *C4BPA* and *C4BPB* genes by acute phase cytokines. *J. Immunol.* 155, 4037-4043.
- Pardo-Manuel de Villena, F., and Rodríguez de Córdoba, S. (1995). *C4BPAL2*, a second duplication of the *C4BPA* gene in the human RCA gene cluster. *Immunogenetics* 41, 139-143.
- Rodríguez de Córdoba, S., and Vivanco, F. (1995). Complemento. In *Medicina Interna* (13th Edition), Ferreras and Rozman, eds. (Barcelona: Doyma), pp. 2633-2640.
- Sánchez-Corral, P., Criado, O., and Rodríguez de Córdoba, S. (1995). Isoforms of Human C4b-binding Protein. I. Molecular basis for the C4BP isoform pattern and its variations in human plasma. *J. Immunol.* 155, 4030-4036.
- Accardo, P., Sánchez-Corral, P., Criado, O., García E., and Rodríguez de Córdoba, S. (1996). Binding of human complement component C4b-binding protein (C4BP) to *Streptococcus pyogenes* involves the C4b-binding site. *J. Immunol.* 157, 4935-4939.
- Arenzana, N., and Rodríguez de Córdoba, S. (1996). The promoter region of the the human gene coding for the β -chain of C4b-binding protein. HNF3 and NFI/CFT transcription factors are required for the efficient expression of *C4BPB* in HepG2 cells. *J. Immunol.* 156, 168-175.
- Fernández-Cañón J.M., Granadino B., Beltrán-Valero de Bernabé D., Renedo M., Fernández-Ruiz E., Peñalva M.A., and Rodríguez de Córdoba, S. (1996). The molecular basis of alkaptonuria. *Nature Genet.* 14, 19-24.
- Pardo-Manuel de Villena, F., Heine-Suñer, D., and Rodríguez de Córdoba, S. (1996). Ordering of the human regulator of complement activation gene cluster on 1q32 by two-colour FISH. *Cytogenet. Cell. Genet.* 72, 339-341.

Próxlmos Artículos/Forthcoming Articles

- Criado, O., González-Rubio, C., López-Trascasa, M., Pascual-Salcedo, D., Munuera, L., and Rodríguez de Córdoba, S. (1997). Modulation of C4b-binding protein isoforms during the acute phase response caused by orthopedic surgery. *Haemostasis.* 27, 25-34
- Criado-García, O., and Rodríguez de Córdoba, S. Sistema del complemento, sus receptores y proteínas reguladoras. *Medicine* (en prensa, 1997).
- Heine-Suñer, Damián, Díaz-Guillén, M.A., Pardo-Manuel de Villena, F., Robledo, M., Benítez, J., and Rodríguez de Córdoba, S. A high resolution map of the regulator of complement activation (*RCA*) gene cluster on 1q32 that integrates new genes and markers. *Immunogenetics* (en prensa, 1997).

Virología Molecular de Vaccinia

Molecular Virology of Vaccinia

EDUARDO PÁEZ ABRIL

Jefe de Grupo/Group Leader
Investigador/Senior Investigator

ESTHER TAPIA CORRALES

MARÍA DEL CARMEN SANCHO MOLINA

B. Predoctorales/Graduate Students

FRANCISCO GARCÍA TABARES

BÁRBARA MORENO JIMÉNEZ (A TIEMPO PARCIAL)

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 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.

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.

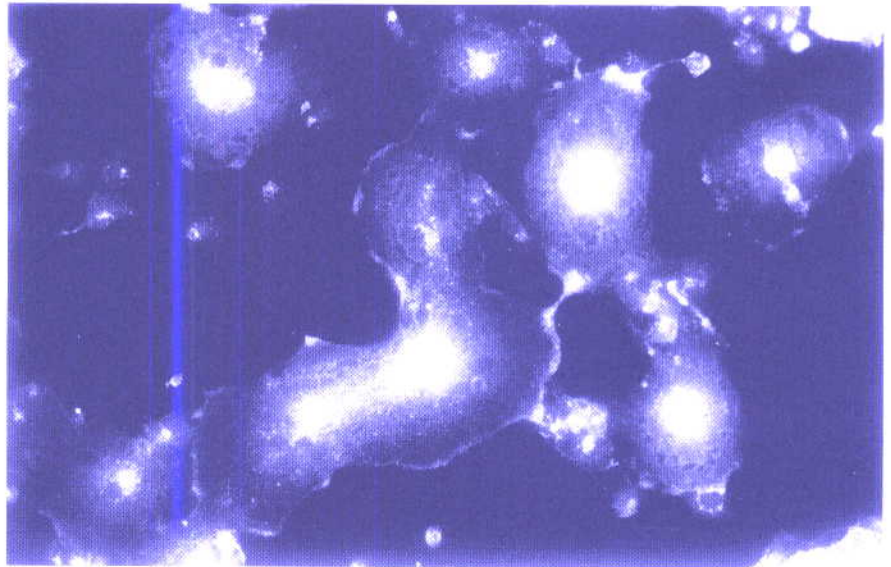
We have characterized several genes involved in virus-host interactions, which have important implications in virulence. These genes are relevant in virus penetration and egress from the cell, in viral dissemination, in viral induction of humoral and cellular immunity and in modulation of the host defense 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.

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

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.

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.

Fotografía: Fusión celular inducida por el virus vaccinia. Un análisis por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico de una proteína de la envuelta vírica nos permite visualizar el proceso. Prolongaciones citoplasmáticas con viriones en su extremo saliendo de la célula iniciarían el contacto con células o policariocitos vecinos. Una vez fusionadas las células, las proteínas de la envuelta vírica quedan durante un tiempo acumuladas en las zonas de contacto para posteriormente diluirse por la membrana plasmática.



Photography: Cellular fusion induced by vaccinia virus. Immunofluorescent analysis with an specific antibody against a viral envelope protein. Cytoplasmic projections with virions exiting at their tip initiate contacts with neighbouring cells or polykaryocytes. Once cell fusion occurs, the envelope proteins remain in the region of contact and later on they spread on the plasma membrane.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CEE, HCM Program, ERB4050PL930462. (1993-1996).
- CICYT, BIO94-0118, (1994-1997).

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Raab, U., Langa, C., Letamendía, A., Lastres, P., Páez, E., and Bernabéu, C. (1997). Characterization of anti-CD105 monoclonal antibodies using recombinant *vaccinia* virus. In *Leucocyte Typing VI* (ed. T. Kishimoto et al.). Garland Publishing, Inc., New York.

Artículos de Divulgación/Press Articles

- Páez, E. (1996). Comentario sobre el trabajo: "Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: Prediction of specific host response-evasion genes". *Science* 273, 813. *Virología*. 4, 63-64.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR
DEPARTMENT OF MOLECULAR MICROBIOLOGY

Jefe de Departamento / *Department Head*

ÁNGEL T. MARTÍNEZ FERRER
ERNESTO GARCÍA LÓPEZ (HASTA I-1996)

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
VÍCTOR DE LORENZO PRIETO
ÁNGEL T. MARTÍNEZ FERRER
MONIQUE NOVAES-LEDIEU
MIGUEL ÁNGEL PEÑALVA SOTO
GERTRUDIS DE TORRONTÉGUI
M^ª DEL PILAR VILAS MINONDO

Colaboradores Científicos

M^ª ELENA FERNÁNDEZ-TRESGUERRES
PEDRO GARCÍA GONZÁLEZ
ALDO GONZÁLEZ BECERRA
M^ª DEL CARMEN GUTIÉRREZ RUEDA
MARÍA JESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

Titulados Superiores Especializados

SARA ISABEL PÉREZ PRIETO
SYLVIA RODRÍGUEZ SAINT-JEAN

Secretaria

M^ª VICTORIA LAFITA TOGORES

Biodegradación de la Lignina

Lignin Biodegradation

ÁNGEL T. MARTÍNEZ FERRER

Jefe de Grupo/*Group Leader*

M^a JESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ
Investigadores/*Senior Investigators*

JOSÉ MARÍA BARRASA GONZÁLEZ

BRIGGITE BÖCKLE (DESDE II-1995)

FRANCISCO GUILLÉN CARRETERO

SOVAN SARKAR (V-1995/VIII-1996)

Investigadores Asociados/*Associate Researchers*

SUSANA CAMARERO FERNÁNDEZ

ANA GUTIÉRREZ SUÁREZ (HASTA V-1995)

M^a JOSÉ MARTÍNEZ IÑIGO

CARMEN MUÑOZ MARTÍN

B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

LUCILIA CAMELO

JAVIER RUIZ DUEÑAS

ELISA VARELA SANZ

B. Predoctorales/*Graduate Students*

ÁNGELES GUIJARRO RODRIGUEZ

TERESA RAPOSO TRIANO

CARMELINA RODRÍGUEZ MUÑOZ

Personal Técnico/*Technical Staff*

Durante el periodo de la presente memoria se han desarrollado tres líneas de trabajo relacionadas con los proyectos de I+D citados más adelante:

Palabras clave: Lignina, hongos, enzimas, oxígeno activo, biotecnología, biodegradación.

I. Estudio y evaluación de los mecanismos enzimáticos y radicalarios en la degradación de la lignina por hongos de los géneros *Pleurotus* y *Phanerochaete*

Se llevan a cabo estudios sobre la biodegradación de la lignina utilizando como modelo los sistemas ligninolíticos de *Pleurotus eryngii* y *Phanerochaete flavid-alba*. La primera tarea

Three research lines were carried out during the 1995-96 period, corresponding to the different R+D projects cited below:

Keywords: Lignin, fungi, enzymes, activated oxygen, biotechnology, biodegradation.

1. An evaluation of enzymatic and radical-mediated reactions in lignin attack by fungi from the genera *Pleurotus* and *Phanerochaete*

*We propose to study different aspects of lignin biodegradation, using as models the ligninolytic systems of *Pleurotus eryngii* and *Phanerochaete flavid-alba*. The first task is the study of the MnP from *P. eryngii*: characterization, cloning and sequencing, catalytic properties and regulation. The second task in the project will be*

es el estudio detallado de la MnP de *P. eryngii*: caracterización, clonación y secuenciación, propiedades catalíticas y regulación. La segunda tarea a desarrollar será caracterizar y determinar las propiedades catalíticas de la lacasa de *P. flavido-alba* así como determinar si *P. chrysosporium* posee el gen de esta enzima. Por otra parte, diferentes evidencias sugieren que las enzimas no llevan a cabo un ataque directo a la lignina dentro de la pared vegetal. Se considerará el papel mediador del Mn(III) producido por la MnP pero, para iniciar el ataque, parecen necesarios oxidantes más enérgicos. El radical hidroxilo, cuya generación a partir del *redox cycling* de las quinonas constituye otra de las tareas planteadas, podría desempeñar esta función. Finalmente, las dos últimas tareas tienen por objeto establecer la importancia de enzimas y radicales en el proceso de degradación.

II. Deslignificación biológica en la fabricación del papel: Optimización de mezclas de enzimas para el tratamiento de paja de cereales y otros materiales no leñosos

El objetivo de este estudio es optimizar tratamientos enzimáticos para la deslignificación de la paja de cereales –a través de una aproximación interdisciplinar que tiene 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.

III. Estudio de los extraíbles de la madera en la fabricación de pasta y papel: Implicaciones técnicas y ambientales y eliminación biológica

Los objetivos de este estudio son: i) evaluar soluciones biotecnológicas para eliminar los compuestos responsables de los problemas de *pitch* de la madera (*Eucalyptus globulus* y *Pinus sylvestris*) y la pasta de papel; ii) determinar la influencia de la eliminación de estos compuestos sobre la calidad de la pasta y el papel, y la toxicidad de las aguas residuales; y iii) identificar los constituyentes del *pitch* responsables del deterioro de la calidad

to characterize and establish the catalytic properties of laccase from *P. flavido-alba* and to detect the presence of laccase genes in *Phanerochaete chrysosporium*. Some pieces of evidence suggest that the ligninolytic enzymes are not responsible for the direct attack to the lignin polymer in plant cell-wall. The mediator role of chelated Mn(III) will be investigated, but stronger oxidants seem necessary to initiate the attack. This could be the role of hydroxyl radical, which will be investigated as a product of quinone redox cycling. Finally, the last tasks concern evaluation of the relevance of enzymatic and radical-mediated attacks to lignin.

II. Biological delignification in paper manufacture: Optimization of enzyme mixtures for treating cereal straw and other non-woody materials

The objective of this study is to optimize enzymatic treatments for straw delignification –through an interdisciplinary approach that takes 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 treatments.

III. Wood extractives in pulp and paper manufacture: technical and environmental implications and biological removal

The objectives of this study are: i) to evaluate biotechnological solutions for eliminating problematic pitch compounds from wood (*Eucalyptus globulus* and *Pinus sylvestris*) and pulp; ii) to determine the influence of eliminating these compounds in pulp and paper quality and wastewater toxicity; and iii) to identify the pitch constituents responsible for poor pulp and paper quality as well as effluent toxicity. The term *pitch* is applied to both wood extractives and to the deposits these extractives cause during pulping and papermaking processes. Different aspects of pitch problematic will be considered in the proposed project, which includes two pulp and paper companies. The identification of compounds responsible for pitch deposits constitutes one of the first tasks, in order to define control strategies. After the elimination of chlorine from pulp bleaching, the extractives constitute one of the most important environmental problem in wastewater

del papel y de la toxicidad de los efluentes. El término *pitch* se aplica tanto a los extraíbles de la madera como a los depósitos que estos extraíbles causan durante los procesos de fabricación de pasta y papel. Diferentes aspectos de la problemática del *pitch* son considerados en el presente estudio, en el que participan dos compañías productoras de pasta de papel. La identificación de los componentes responsables de los depósitos de *pitch* constituye una de las primeras tareas con objeto de definir las estrategias para su control. Por otra parte, tras la eliminación del cloro en el blanqueo de la pasta, los extraíbles constituyen uno de los más importantes problemas ambientales en las aguas residuales de las fabricas de pasta de papel. El uso de organismos y enzimas para tratar la madera o la pasta, respectivamente, ofrece la posibilidad de introducir procesos respetuosos con el entorno en la manufactura de pasta y papel. El presente estudio permitirá identificar los mejores biocatalizadores con objeto de llevar a cabo un eficiente control de los depósitos de *pitch* en la pasta y de la toxicidad de los efluentes.

from pulp and paper mills. The use of organisms and enzymes, to treat wood or pulp respectively, offers the possibility to introduce environmentally-friendly procedures in pulp and paper manufacture. These studies will result in the identification of biocatalysts with improved effectiveness towards selective extractive removal, to be used for eliminating pitch and effluent toxicity problems.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- AIR-EU, AIR2-CT93-1219. Coordinator: A.T. Martínez. (1994-1997).
- CICYT-Biotecnología, CICYT BIO96-0393. (1996-1999).
- FAIR-UE, FAIR-PL95-560, CIB-IP. (1995-1998).
- CICYT-Biotecnología, BIO96-2504-CE. (1996-99).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Susana Camarero. Estudio de la deslignificación de paja de trigo con *Pleurotus* para la fabricación de pasta de papel. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Director: A.T. Martínez.
- Ana Gutiérrez. Exopolisacáridos y metabolitos aromáticos de *Pleurotus*: Naturaleza y función en la degradación de la lignina. Universidad de Sevilla, 1995. Director: A.T. Martínez.
- María del Carmen Muñoz. Caracterización y purificación de las lacasas de *Pleurotus eryngii*. Aplicaciones en relación con la degradación de la lignina. Universidad Complutense de Alcalá de Henares, 1995. Director: M.J. Martínez.

Publicaciones/Publications

- Alconada, M.T., and Martínez, M.J. (1995). Aislamiento de protoplastos en tejidos vegetales por enzimas líticas extracelulares de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Rev. Argentina Microbiol. 27, 191-197.
- Barrasa, J.M., Camarero, S., Martínez, A.T., and Ruel, K. (1995). Ultrastructural aspects of wheat straw degradation by *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. Appl. Microbiol. Biotech. 43, 766-770.

- Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Almendros, G., Prieto, A., González-Vila, F.J., and Martínez, A.T. (1995). Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. *Sci. Total Environ.* **167**, 315-328.
- Martínez, A.T., Barrasa, J.M., Martínez, M.J., Almendros, G., Blanco, M., and González, A. E. (1995). *Ganoderma australe*: a fungus responsible for extensive delignification of some austral hardwoods. In *Ganoderma*. Systematics, Phytopathology and Pharmacology, ed. Buchanan, P.K., Hseu, R.S. and Moncalvo, J.M. (Taipei: National Taiwan University), pp. 67-77.
- Peláez, F., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.* **99**, 37-42.
- Alconada, T.M. and Martínez, M.J. (1996). Purification and characterization of a β -glucosidase from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**, 106-110.
- Bocchini, P., Galletti, G.C., Seraglia, R., Traldi, P., Camarero, S., and Martínez, A.T. (1996). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of natural and synthetic lignin. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **10**, 1144-1147.
- Camarero, S., Böckle, B., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1996). Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *App. Environ. Microbiol.* **62**, 1070-1072.
- Camarero, S., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1996). Lignin-degrading enzymes produced by *Pleurotus* species during solid-state fermentation of wheat straw. In *Advances in Solid State Fermentation*, ed. Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., and Viniegra-Gonzalez, G. (Dordrecht: Kluwer Acad. Publ.), pp. 335-345.
- Checa, J., Barrasa, J.M., Martínez, A.T., Blanco, M.N., and Lado, C. (1996). *Bicornispora exophiala*, a new genus and species of the Coryneliales and its black yeast anamorph. *Mycol. Res.* **100**, 500-504.
- Galletti, G.C., Bocchini, P., Martínez, A.T., and Pelayo, M. (1996). Use of analytical pyrolysis for the characterization of paper industry effluents. *Anal. Chim. Acta* **17626**, 1-7.
- Guadalix, M.E., Almendros, G., Blanco, M.J., Camarero, S., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Vares, T., Hatakka, A., Pelayo, M., and Gago, E. (1996). Assessment of boardmaking parameters of pulps prepared by soda cooking, fungal delignification or enzymatic treatment of wheat straw. In *Enzymes for Pulp and Paper Processing*, ed. Jeffries, T.W. & Viikari, L. (Washington: ACS) 241-256.
- Guadalix, M.E., Almendros, G., Martínez, A.T., Camarero, S., Barrasa, J.M., and Pelayo, M. (1996). Comparative analysis of wheat straw paperboards prepared after biomechanical and semichemical pulping. *Biores. Technol.* **57**, 217-227.
- Guillén, F., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1996). Hydroxyl radical production by *Pleurotus eryngii* via quinone redox-cycling. In *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research*, ed. Messner, K. & Srebotnik, E. (Vienna: Facultas-Universitätsverlag), pp. 389-392.
- Gutiérrez, A., Bocchini, P., Galletti, G.C., and Martínez, A.T. (1996). Analysis of lignin-polysaccharide complexes formed during grass lignin degradation by cultures of *Pleurotus* species. *App. Environ. Microbiol.* **62**, 1928-1934.
- Gutiérrez, A., Prieto, A., and Martínez, A.T. (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohy. Res.* **281**, 143-154.
- Martínez, M. J., Böckle, B., Camarero, S., Guillén, F., and Martínez, F. (1996). MnP isoenzymes produced by two *Pleurotus* species in liquid culture and during wheat straw solid-state fermentation. In *Enzymes for Pulp and Paper Processing*, ed. Jeffries, T.W. & Viikari, L. (Washington: ACS) 183-196.

- Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1996). Mn-Peroxidases of *Pleurotus eryngii* exhibiting Mn-independent activities on 2,6-dimethoxyphenol and veratryl alcohol. In *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research*, ed. Messner, K. & Srebotnik, E. (Vienna: Facultas-Universitätsverlag), pp. 417-420.
- Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F., and Martínez, A.T. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* **237**, 424-432.
- Muñoz, C., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Blanco, R.M., and Guisán, J.M. (1996). Studies on physically and chemically-immobilized laccase from *Pleurotus eryngii*. In *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research*, ed. Messner, K. & Srebotnik, E. (Vienna: Facultas-Universitätsverlag), pp. 43-46.
- Ruiz-Dueñas, F.J., and Martínez, M.J. (1996). Enzymatic activities of *Trametes versicolor* and *Pleurotus eryngii* implicated in bio-control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Curr. Microbiol.* **32**, 151-155.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Camarero, S., Galletti, G.C., and Martínez, A.T. (1997). Demonstration of *in situ* oxidative degradation of lignin side-chains by two white-rot fungi using analytical pyrolysis of methylated wheat straw. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **11**, 331-334.
- Galletti, G.C., Bocchini, P., Guadalix, M.E., Almendros, G., Camarero, S. and Martínez, A.T. Pyrolysis products as markers in the chemical characterization of paperboards from waste paper and wheat straw pulps. *Biores. Technol.* (en prensa, 1997).
- Guadalix, M.E., Almendros, G., Martínez, A.T., González-Vila, F.J., and Lankes, U. A ^{13}C CP/MAS NMR evaluation of the structural changes in wheat straw subjected to different chemical and biological pulping conditions. *Biores. Technol.* (en prensa, 1997).
- Guillén, F., Martínez, M. J., Muñoz, C., and Martínez, A.T. (1997). Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**, 190-191.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr. Microbiol.* **34**, 1-5.
- Sarkar, S., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta* (en prensa, 1997).

Bioquímica de Hongos *Biochemistry of Fungi*

CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA

Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigadora/*Senior Investigator*

MONIQUE NOVAES-LEDIEU

(JUBILACIÓN, VIII-1994)

AMELIA PÉREZ CABO

Investigadoras Asociadas/*Associate Researchers*

DOLORES BERNARDO LÓPEZ (DESDE X-96)

MYRIAM CALONJE MACAYA

BEATRIZ GALÁN SICILIA (DESDE X-95)

B. Predoctorales/*Graduate Students*

ELOY BLANCO MARCOS

Personal Técnico/*Technical Staff*

Palabras clave: Polisacáridos, pared celular, polisacaridasas, *Agaricus bisporus*, *Verticillium fungicola*.

La pared celular de *Agaricus bisporus* constituye un modelo específico para estudios de morfogénesis. En cuanto a sus aplicaciones prácticas dicha pared celular es la barrera natural en los importantes procesos de micoparasitismo producidos por *Verticillium fungicola*, constituyendo una estructura particular en cada una de las diferentes cepas estudiadas de *A. bisporus*.

Los objetivos principales de nuestro estudio son:

I. Aislamiento y caracterización de polisacáridos de la pared celular de nuevas cepas de *A. bisporus* en sus dos fases de micelio vegetativo y micelio agregado, por tratarse de marcadores específicos de cada cepa así como de substratos, tanto de los enzimas implicados en la morfogénesis de la pared

Keywords: *Polysaccharides, cell wall, polysaccharidases, Agaricus bisporus, Verticillium fungicola.*

The Agaricus bisporus cell wall constitutes a specific model for morphogenetic studies. With regard to practical applications such walls are a natural barrier against important mycoparasitism processes produced by Verticillium fungicola constituting a particular structure in each one of the different studied A. bisporus strains

The main objectives of our study are:

I. Isolation and characterization of wall polysaccharides of A. bisporus new strains in the two phases of vegetative and aggregated mycelia. These polysaccharides behave as specific markers of every strain as well as substrates of the enzymes involved in A. bisporus cell wall morphogenesis, or of the enzymes produced during the mycoparasitism by V. fungicola.

celular de *A. bisporus* como de los enzimas producidos durante el micoparasitismo por *V. fungicola*.

II. Purificación y caracterización de diferentes glucanasas de *Agaricus bisporus* dado su papel regulador de la síntesis de los polisacáridos estructurales de la pared en su necesaria expansión durante el crecimiento, así como la posterior ramificación de dichos polisacáridos para la completa madurez de esta pared.

III. Preparación y caracterización de las siguientes polisacaridasas de *V. fungicola*: β (1-3), α (1-6), β (1-3) y (1-4) glucanasas, β (1-4) xilanasa y quitinasas producidas durante su parasitismo sobre los cultivos industriales de *A. bisporus*, introduciéndonos en el mecanismo molecular de esta infección.

II. Purification and characterization of different *A. bisporus* glucanases as regulators of the wall structural polysaccharide synthesis in the necessary wall expansion during growth, and also in the polysaccharide branching for the complete wall maturity.

III. Preparation and characterization of the following *V. fungicola* polysaccharidases: β (1-3) and (1-6), α (1-3) and (1-4) glucanases, β (1-4) xylanase and chitinases produced during its parasitism on *A. bisporus* industrial cultures, penetrating the molecular mechanism of this infection.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB 920001. (1993-1995).
- DGICYT, PB 95-0078-C02-02. (1996-1997).
- Comunidad de Castilla-La Mancha 93/CH-31. (1993-1996).

Publicaciones/Publications

- Calonje, M., García Mendoza, C., Pérez Cabo, A, and Novaes-Ledieu, M. (1995). Some significant differences in wall chemistry among four commercial *Agaricus bisporus* strains. *Curr. Microbiol.* 30, 111-115.
- Calonje, M., García Mendoza, C., Novaes-Ledieu, M., and Labarère, J. (1995). Characterization of two commercial *Agaricus bisporus* strains by cell wall structure, isozyme patterns, nuclear and mitochondrial restriction fragment length polymorphisms (RFLP). *Mushroom Sci.* 14, 133-140.
- Calonje, M., García Mendoza, C., and Novaes-Ledieu, M. (1996). New contributions to the wall polysaccharide structure of vegetative mycelium and fruit body cell walls of *Agaricus bisporus*. *Microbiología SEM* 12, 599-606.
- García Mendoza, C., Pérez Cabo, A., Calonje, M., Galán, B., and Novaes-Ledieu, M.(1996). Chemical and structural differences in cell wall polysaccharides of two monokaryotic strains and their resulting dikaryon of *Agaricus bisporus*. *Curr. Microbiol.* 33, 211-215.

Próximos Artículos/Forthcoming Papers

- García-Mendoza, C., Calonje, M., Pérez-Cabo, A., Galán, B., and Novaes-Ledieu, M. Aplicaciones del estudio de los polisacáridos de la pared celular de *Agaricus bisporus* (champiñón) como marcadores bioquímicos para la caracterización de cepas y por su posible relación con la incidencia de la enfermedad "mole seca". Investigación Agraria en Castilla-La Mancha. Area de Cultivos (en prensa, 1997).

Artículos de Divulgación/Press Articles

- García Mendoza, C. (1995). Evolución de la Sociedad de Microbiólogos Españoles y consolidación y expansión de la Sociedad Española de Microbiología. En: Cincuenta años de la Sociedad Española de Microbiología, C. Gil García y M. C. de la Rosa Jorge, eds. (Sociedad Española de Microbiología) pp 26-34.
- García Mendoza, C. (1995). Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, I. De 1946 a 1971. Microbiología SEM 11, 359-368.
- García Mendoza, C. (1995). Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, II. De 1971 a 1977. Microbiología SEM 11, 491-498.
- García Mendoza, C. (1996). Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, III. De 1977 a 1983. Microbiología SEM 12, 107-116.
- García Mendoza, C. (1996). Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, IV. De 1983 a 1987. Microbiología SEM 12, 307-316.
- García Mendoza, C. (1996). Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, V. De 1987 a 1991. Microbiología SEM 12, 457-464.
- García Mendoza, C. (1996). Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, VI. De 1991 a 1995. Microbiología SEM 12, 621-630.

Virología en Acuicultura

Virology in Fish-Aquaculture

SARA ISABEL PÉREZ PRIETO

Jefe de Grupo/Group Leader

M^a DEL CARMEN GUTIÉRREZ RUEDA

SYLVIA RODRÍGUEZ SAINT-JEAN

M^a DEL PILAR VILAS MINONDO

Investigadoras/Senior Investigators

CARMEN DE LA ROSA

Investigadora Asociada/Associate Research

MARTA ALONSO FERNÁNDEZ

MICHAEL KILEMADE (VII a XII 1996)

M^a ÁNGEL PALACIOS FONTCUBERTA

B. Predoctorales/Graduate Students

PILAR MARCILLA CAVANILLAS

M^a MERCEDES SÁNCHEZ CARMONA

BÁRBARA MORENO JIMÉNEZ (A TIEMPO PARCIAL)

Personal Técnico/Technical Staff

Las estrategias para eludir la introducción de virus en instalaciones de acuicultura, han sido abordadas de diversas formas, desde un conocimiento mejor de las patogénesis de las infecciones víricas y la respuesta inmune, hasta el planteamiento de estudios a nivel genómico o la mejora de métodos de diagnóstico rápido, que son fundamentales cuando es preciso controlar la dispersión de los virus causantes de enfermedad. Las líneas de investigación en el laboratorio son:

I. Caracterización de Birnavirus, Rhabdovirus y Aeromonas implicados en enfermedades de peces. Análisis de interacciones y factores de virulencia

Palabras clave: Virus de peces, IPNV, IHNV, furunculosis.

Se plantea el estudio de las características biológicas, bioquímicas, antigénicas y moleculares de cepas de virus que hemos aislado en instalaciones españolas de acuicultura durante 4 años. Como parte del proyecto, también han sido caracterizadas (por las Dras. Gutiérrez y Palacios) 18 cepas de *Aeromonas salmonicida* y 8 cepas de *Streptococcus*.

Prevention of virus introduction into aquaculture facilities has been boarded in different ways, from a better knowledge of the pathogenesis of fish viral infections and immunological responses, to the indeep studies at the genomic level or the improvement of rapid and effective diagnostic methods, that are critical if dissemination of the viruses causing diseases are to be controlled. The current research lines in the laboratory include:

I. Characterization of some Birnavirus, Rhabdovirus and Aeromonas involved in fish diseases. Interactions and virulence studies

Keyword: Fish viruses, IPNV, IHNV, furunculosis.

*We attempt the study of the biological, biochemical, antigenical and molecular characteristics of the viral strains that have isolated in Spanish fish farms over a 4 year period. As a part of the project, 18 strains of *Aeromonas salmonicida* and 8 strains of *Streptococcus*, have been also characterized by Drs. Gutiérrez and Palacios. We have demonstrated previously that the Birnavirus Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is*

Habíamos demostrado previamente que el Birnavirus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) está ampliamente extendido por las instalaciones españolas de cultivo de salmónidos. Nosotros hemos conseguido alrededor de 100 aislados de IPNV y hemos determinado sus relaciones antigénicas con virus de referencia, basándonos en la clasificación serológica hoy vigente. Nuestros resultados demostraron que el 81% de los aislados españoles de IPNV fueron de serotipo Sp (A₂) y el 19% de serotipo Ab (A₃). La similitud antigénica de los IPN virus se ha explicado a nivel genómico y de proteínas y se han hecho intentos para correlacionar la heterogeneidad genética con los diferentes serotipos. Sin embargo la clasificación del IPNV aún debe ser establecida a nivel genómico. Nosotros estamos utilizando la técnica de RT-PCR para amplificar el cDNA que codifica el epitopo serotipo-específico, el gen VP2, de 30 de los aislados silvestres de IPNV. Los fragmentos amplificados se digieren con cuatro enzimas de restricción y los perfiles obtenidos en geles de agarosa se comparan para encontrar las variaciones genómicas entre las cepas. Recientemente, estamos también interesados en rhabdovirus de salmónidos porque aislamos uno, serológicamente relacionado con el virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV), el agente causal de la enfermedad vírica más frecuente en salmónidos en USA. Nuestro aislado se obtuvo de trucha arco-iris, en una infección doble con IPNV; este tipo de coinfecciones están poco estudiadas y tienen repercusión para el diagnóstico y control de la enfermedad. Como parte de nuestro proyecto 1) hemos mejorado el método para demostrar por PCR la coinfección; 2) estamos secuenciando el producto de PCR del gen G del rhabdovirus para analizar sus diferencias con cepas de referencia; 3) estamos interesados en determinar la cinética de multiplicación de los virus implicados en la coinfección, *in vitro* e *in vivo*.

II. Desarrollo de métodos de diagnóstico y estudio de virus líticos y latentes que afecten a dorada (*Sparus aurata* L.)

Palabras clave: Virus de peces, métodos diagnósticos, Birnavirus, Linfocistis.

Una de las principales causas de dispersión de los virus de peces es el transporte de animales vivos portadores de virus y

widely spread on the Spanish salmonid fish farms. The virus causes a severe disease in the younger fish and consequently, important economical losses. We have obtained about 100 IPNV isolates and the antigenic relationship with known reference viruses were determined on the basis of the presently used serologic classification. Our results revealed that 81% of the Spanish IPNV isolates were serotype Sp (A₂) and 19% were serotype Ab (A₃).

The antigenic similarity of IPN viruses has been explained at the protein and genomic level and attempts to correlate genomic heterogeneity with the different serotypes have been done. However IPNV classification has yet to be established at the genomic level. We use the RT-PCR assay to amplify cDNA encoding the serotype-specific epitope of the VP2 gene of 30 wild IPNV strains. Fragments amplified are digested with 4 different restriction enzymes and the restriction fragment profiles obtained on agarose gels are being compared for the genomic variations between the strains tested.

Recently we have also become interested in salmonid rhabdovirus because we isolated one, serologically related to Infectious Hematopoyetic Necrosis Virus, the causal agent of the most frequent viral disease in USA. Our isolate was obtained from rainbow trout, in a dual infection with IPN virus; these types of co-infections are poorly known and have immediate implications in diagnostics and in the control of the disease. As a part of our project, 1) we have improved a method to demonstrate co-infections by PCR; 2) we are sequencing the PCR product of the rhabdovirus G gene to analyze differences with the viral reference strains; 3) we are now interested in determining how one or both of the viruses involved in the dual infection actually support multiplication *in vitro* and *in vivo* systems.

II. Development of diagnostic methods and study of lytic and persistent viruses affecting gilt head seabream (*Sparus aurata* L.)

Keywords: Fish viruses, diagnostic methods, Birnavirus, Lymphocystis.

A major factor in the spread of fish viruses is the transfer of live carrier fish and contaminated eggs, so new diagnostic methods are needed for implementing fish health regulations and

de huevos contaminados; por ello se necesitan nuevos métodos de diagnóstico que mejoren las medidas de control y prevención. Nosotros estamos aplicando (en un proyecto coordinado con otras Instituciones) métodos como el PCR y la citometría de flujo, para la detección de virus que afectan a dorada, comparándolos con otras técnicas estándar utilizadas tradicionalmente en el diagnóstico de virus de salmónidos. Puesto que estas técnicas se están aplicando también al muestreo de poblaciones de peces, podremos determinar que tipo de virus líticos afectan a esta especie y si pueden establecer estrategias de persistencia, como virus latentes. Hasta ahora solo hemos aislado un tipo de virus, el iridovirus Linfocistis y estudiaremos la capacidad de esta especie como reservorio del virus.

control. We are developing, (in coordinated project with researchers from other institutions) new methods as PCR and flow cytometry for the detection of viruses affecting seabream in comparison with other standard techniques traditionally used for salmonid virosis. Because the techniques are being also applied to sampling fish populations, the performance of these methodologies allow us to determine the main lytic viruses of this fish species and in addition to study the capability of these viruses to establish persistent strategies, as latent viruses. At the moment only one type of virus, the Iridoviridae Linfocistis has been isolated and the potentiality of gilt-head seabream as virus reservoir will be studied too.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, AGF 95-0016. (1995-1998).
- CICYT, MAR 95 1949-C02-01. (1995-1998).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- M^a Ángel Palacios Fontcuberta. Análisis sanitario-ambiental de las instalaciones de acuicultura continental españolas y estudio de los microorganismos patógenos implicados. Universidad Complutense de Madrid, 1996. Directoras: M.C. Gutiérrez Rueda y S.I. Pérez Prieto.

Publicaciones/Publications

- Rodríguez, S., Vilas, M.P., Gutiérrez, M.C., and Pérez, S.I. (1995). In vitro quantitative kinetic study of infectious pancreatic necrosis viral antigen by flow cytometry. *Fish Pathol.* 30 (1), 1-5.
- Rodríguez, S., Vilas, M.P., Alonso, M., and Pérez, S.I. (1995). Study of a viral-dual infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by seroneutralization, Western blot and polymerase chain reaction assays. *Microbiología SEM* 11, 461-470.
- Vilas, M.P., Rodríguez, S., Gutiérrez, M.C., Furones, M.D., and Pérez, S.I. (1995). Primer seguimiento virológico en poblaciones de peces cultivados en la Comunidad Autónoma Balear. En *Actas de Acuicultura V*, F. Castelló y A. Calderer, eds. Publicacions de la Universitat de Barcelona-Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Rodríguez, S., Vilas, M.P., Gutiérrez, M.C. and Pérez, S.I. (1996). Efficacy of a serum-free medium for the culture of salmonid fish leucocytes. *Fish Pathol.* 31 (4), 229-231.

Próximos Artículos/Forthcoming Articles

- Pérez, S.I., and Rodríguez, S. Major viral diseases affecting fish aquaculture in Spain. *Microbiología SEM* (en prensa, 1997).
- Rodríguez, S., Vilas, M.P., Sarasquete, M.C., Rodríguez, R.B., Gutiérrez, M.C. and Pérez-Prieto, S.I. Isolation and preliminar characterization of a Birnavirus from *Solea senegalensis* in southwest Spain. *J. Aqua. Animal Health* (en prensa, 1997).

Carbohidratos Microbianos

Microbial Carbohydrates

JUAN ANTONIO LEAL OJEDA
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

BEGOÑA GÓMEZ-MIRANDA
B. Postdoctoral/*Postdoctoral Fellow*

OUSSAMA AHRAZEM
JEZABEL DOMENECH MANTECA
B. Predoctorales/*Graduate Students*

JESÚS LÓPEZ RAMÍREZ
Personal Técnico/*Technical Staff*

Palabras clave: Pared celular, polisacáridos fúngicos, espectroscopía RMN, anticuerpos, quimiotaxonomía.

Se ha continuado el estudio de los polisacáridos solubles en agua obtenidos de los extractos alcalinos de paredes celulares fúngicas. Las diferencias en composición y estructura de estos polisacáridos permiten su utilización como caracteres quimiotaxonómicos, para establecer las relaciones entre estados anamórficos y teleomórficos y la evolución de los diferentes grupos.

Análisis estructural

En colaboración con el Dr. Bernabé y su equipo, (Grupo de Carbohidratos, Instituto de Química Orgánica CSIC), se han determinado las estructuras siguientes: un manano obtenido de *Microsporium gypseum* y otros dermatofitos; varios galactanos de diversas especies de *Talaromyces*, que han per-

Keywords: Cell-wall, fungal polysaccharides, NMR spectroscopy, antibodies, chemotaxonomy.

We have carried on the study of the water-soluble polysaccharides obtained from alkali extracts of fungal cell walls. The differences in composition and structure of these polysaccharides allow their utilization as chemotaxonomic characters to establish the relationship between the anamorphic and teleomorphic states and the evolution of the different fungal groups.

Structural analysis

In collaboration with Dr. Bernabé and his team (Grupo de Carbohidratos, Instituto de Química Orgánica CSIC), the following structures have been determined: a mannan obtained from *Microsporium gypseum* and other dermatophytes; various galactans from species of *Talaromyces*, which allowed to relate these species with species of *Penicillium*; a galactofuranan cha-

mitido relacionar estas especies con especies de *Penicillium*; un galactofurano característico de *Aspergillus fumigatus* que también se ha encontrado en especies de *Neosartorya*, su estado perfecto; y un galactomannano en especies de *Neurospora*.

Actividad antigénica

Se han obtenido anticuerpos frente a varios polisacáridos solubles en agua.

En colaboración con la Dra. Barasoain (CIB) se está estudiando la especificidad de estos anticuerpos y su aplicación para caracterizar hongos contaminantes de alimentos o patógenos de animales. Estos anticuerpos se han utilizado con éxito para teñir mediante inmunofluorescencia el micelio de los hongos de los que se ha obtenido el antígeno.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

— DGICYT, PB-92-0001. (1993-1996).

Publicaciones/Publications

- Domenech, J., Barasoain, I., Prieto, A., Gómez-Miranda, B., Bernabé, M., and Leal, J.A. (1996). An antigenic water-soluble galactomannan extracted from cells of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces farinosus*. *Microbiology* 142, 3497-3503.
- Jiménez-Barbero, J., Prieto, A., Gómez-Miranda, B., Leal, J.A., and Bernabé, M. (1995). Chemical structure of fungal cell-wall polysaccharides isolated from *Microsporum gypseum* and related species of *Microsporum* and *Trichophyton*. *Carbohydr. Res.* 272, 121-128.
- Leal, J.A. (1995): Water-soluble polysaccharides of fungal cell walls. In: *Micro-organisms in Ruminant Nutrition* R.A., Prins, and C.S., Stewart, eds. (Nottingham University Press. Nottingham.) pp: 153-165.
- Leal, J.A., Jiménez-Barbero, J., Gómez-Miranda, B., Parra, E., Prieto, A., and Bernabé, M. (1995). Structural investigation of cell-wall polysaccharides from *Neosartorya*: relationships with their putative anamorphs of *Aspergillus*. *Carbohydr. Res.* 273, 255-262.
- Prieto, A., Bernabé, M., and Leal, J.A. (1995). Isolation, purification and chemical characterization of alkali-extractable polysaccharides from the cell walls of *Talaromyces* species. *Mycol. Res.* 99, 69-75.
- Leal, J.A., Jiménez-Barbero, J., Gómez-Miranda, B., Parra, E., Prieto, A., Domenech, J., and Bernabé, M. (1996). Structural investigation of cell-wall galactomannan from *Neurospora crassa* and *N. sitophila*. *Carbohydr. Res.* 283, 215-222.

Próximos artículos/Forthcoming Articles

- Leal, J.A., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., Domenech, B., Ahrazem, O., and Bernabé, M. Possible chemotypes from cell-wall polysaccharides as an aid in the systematic of the genus *Penicillium* and its telomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces* (en prensa, 1997).
- Poveda A., Martín-Pastor, M., Bernabé, M., Leal, J.A., and Jiménez-Barbero, J. Solution conformation and dynamics of a fungal cell-wall polysaccharide isolated from *Microsporum gypseum*. *Glycoconjugate J.* (en prensa, 1997).

characteristic of *Aspergillus fumigatus* also found in species of *Neosartorya*, its perfect state; and a galactomannan from species of *Neurospora*.

Antigenic activity

Antibodies have been obtained against various water-soluble polysaccharides. In collaboration with Dr. Barasoain (CIB) we are studying the specificity of these antibodies and their utilization for the detection of fungal contaminants in food or animal pathogens. These antibodies have been successfully used for staining the mycelium of these fungi, from which these polysaccharides have been obtained by immunofluorescence techniques.

Genética Bacteriana Bacterial Genetics

RUBENS LÓPEZ GARCÍA
Jefe de Grupo/Group Leader

PEDRO GARCÍA GONZÁLEZ
ERNESTO GARCÍA LÓPEZ
JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ
Investigadores/Senior Investigators

ESTRELLA CORTÉS RUBIO (HASTA XII-1995)
EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ (DESDE V-1995)
FRANCISCO JAVIER MEDRANO MARTÍN (HASTA IX-1995)
ROSARIO MUÑOZ MORENO (DESDE II-1996)
ALEJANDRO VIÁN HERRERO (HASTA V-1996)
Investigadores Asociados/Associate Researchers

MARTA MOLLERACH (HASTA I-1996)
A. ISABEL RODRÍGUEZ SÁNCHEZ-BEATO (HASTA X-1996)
B. Postdoctorales/Postdoctoral Fellows

JORGE ALONSO PALACIOS
CARLOS ARRECUBIETA LARRAÑAGA (HASTA IX-1996)
ABEL FERRÁNDEZ BARCA (DESDE I-1995)
SUSANNE JAENECKE (XI-1995)
DANIEL LLULL PEÑALBA (DESDE X-1996)
ANA CARMEN MARTÍN RODRÍGUEZ (HASTA XI-1996)
M^{RE} AUXILIADORA PRIETO JIMÉNEZ (HASTA VIII-1996)
MICHELLE SHEEHAN (HASTA IX-1996)
B. Predoctorales/Graduate Students

ELOÍSA CANO CONGOSTO
MANUEL CARRASCO FERNÁNDEZ
FRANCISCA PILAR MORANTE GONZÁLEZ
Personal Técnico/Technical Staff

I. Estudios moleculares de genes de *Streptococcus pneumoniae* y sus bacteriófagos implicados en patogenicidad

Palabras clave: Neumococo, patogenicidad, cápsula, bacteriófagos, enzimas líticas.

Los principales resultados obtenidos durante el periodo objeto de esta Memoria son los siguientes: a) Clonación y secuenciación de la región responsable de la síntesis de la cápsula de tipo 3 de *S. pneumoniae*, así como de sus regiones flanqueantes. Los genes específicos del serotipo 3 forman una única unidad transcripcional. b) Por vez primera se han caracterizado los productos que codifican los genes imprescindibles en la formación de la cápsula del serotipo 3 como una UDP-glucosa deshidrogenasa y una polisacárido sintasa. La sola presencia de esta sintasa fue suficiente para catalizar la formación de polisacárido capsular tanto en neumococo como en *Escherichia coli*. c) Se ha secuenciado por vez primera el geno-

I. Molecular studies of genes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages involved in pathogenesis

Keywords: *Pneumococcus*, pathogenicity, capsule, bacteriophages, lytic enzymes.

The main results obtained in this subject during 1995-1996 are summarized as follows: a) Cloning and sequencing of the DNA region responsible of the capsular synthesis in type 3 pneumococci and their flanking regions. It has been shown that type 3-specific genes form an operon. b) The biochemical characterization of the gene products required for capsule biosynthesis in *S. pneumoniae* type 3 has been carried out. The Cap3B polysaccharide synthase was the only protein required to synthesize a type 3 capsule both in *S. pneumoniae* and *Escherichia coli*. c) The complete nucleotide sequence of the pneumococcal phage Cp-1 genome and its transcriptional organization have been determined. The phage DNA, that contains a protein covalently

ma completo de un fago de neumococo (Cp-1) (que contiene una proteína unida covalentemente a los extremos 5' de su DNA) habiéndose establecido, asimismo, su organización funcional. Se ha podido concluir que la iniciación de la replicación del DNA de Cp-1 comienza en el tercer nucleótido siguiendo un mecanismo peculiar denominado previamente *sliding-back*. d) Se han sintetizado quimeras enzimáticamente activas fusionando los fragmentos génicos que codifican los dominios C- y N- terminales de la amidasa LytA de neumococo y de la enzima lítica Lyc de un fago de *Lactococcus*, respectivamente. e) Se han clonado y secuenciado genes de *Clostridium acetobutylicum* y de *S. pneumoniae* que presentan la característica de codificar dominios C-terminales implicados en el reconocimiento de sustratos que contienen colina. Los productos codificados por algunos de estos genes podrían estar implicados en la virulencia de neumococo.

Para los próximos años nos proponemos determinar la organización estructural de los genes implicados en la formación de la cápsula de varias estirpes de importancia clínica lo que proporcionará información básica sobre los mecanismos que controlan la formación de las cápsulas de neumococo, su principal factor de virulencia. Un segundo objetivo será profundizar en el estudio de las enzimas líticas del sistema de neumococo, proteínas sobre las que ahora poseemos una gran información en cuanto a su estructura y mecanismo de acción pero de las que carecemos de datos contrastados sobre su papel como factores de virulencia. Se pondrá especial énfasis en el análisis de las enzimas líticas de fagos que presentan peculiaridades bioquímicas no estudiadas hasta ahora. Asimismo, se llevará a cabo un análisis sistemático de la relación existente entre estirpes con relevancia clínica y presencia de fagos atemperados. Se propone el aislamiento de fagos que, a diferencia de los ya conocidos, sean capaces de infectar a estirpes capsuladas de neumococo. Las alteraciones en la respuesta lítica que presentan muchas estirpes patógenas de neumococo que han sido tratadas con antibióticos β -lactámicos ha suscitado un renovado interés en el estudio del sistema lítico de neumococo y, por ello, se ampliarán los estudios físico-químicos ya realizados en nuestro laboratorio a las nuevas enzimas líticas que tenemos en estudio. Además, nos proponemos analizar el papel biológico de la segunda autólisis (una glicosidasa) en *S. pneumoniae*.

linked to its 5' ends, initiates its replication at the third nucleotide following a mechanism previously named *sliding-back*. d) An active chimeric protein was synthesized by constructing a fusion between the gene fragments encoding the C- and N-terminal domains of the LytA pneumococcal amidase and the lytic enzyme Lyc of a *Lactococcus* phage, respectively. e) Several *Clostridium acetobutylicum* and *S. pneumoniae* genes encoding new choline-binding proteins have been cloned and sequenced. Some of these proteins might represent new virulence factors in *S. pneumoniae*.

One of the aims of our future projects is to characterize the organization of the capsular genes of different pneumococcal clinical isolates which will provide information on the mechanisms that regulate the expression of genes involved in capsular biosynthesis. On the other hand, we shall study the lytic enzymes of pneumococcus and its bacteriophages taking into account that they may also represent important virulence factors. The study of some of phage-coded lytic enzymes, showing peculiar biochemical properties, will receive special attention. Moreover, the possible relationships between virulence and lysogeny will be analysed. Special attention will be paid to the isolation of phages able to infect encapsulated pneumococcal strains. On the other hand, it has been reported that many virulent pneumococcal strains treated with β -lactam antibiotics change their usual bacteriolytic response to a bacteriostatic one, an observation that has led to a renewed interest on the role played by the lytic enzymes on the irreversible effects caused by these antibiotics. Consequently, the biological role of the second pneumococcal autolysin, a glycosidase, will be studied in detail.

II. Bioremediation: Analysis and genetic manipulation of bacterial catabolic pathways for the mineralization of aromatics

Keywords: Bioremediation, aromatic compounds, biotransformation, metabolic engineering, 4-hydroxyphenylacetate.

The main results achieved in this subject during 1995-1996 are summarized as follows: a) Cloning and sequencing of the catabolic pathway of 4-hydroxyphenylacetic acid (4-HPA) of *Escherichia coli* W. This represents the first time that a complete catabolic pathway for an aromatic compound was established in *E. coli* and one of the few examples of aromatic catabolic path-

II. Eliminación biológica de contaminantes: Análisis y manipulación de rutas catabólicas bacterianas para la mineralización de compuestos aromáticos

Palabras clave: Biorremediación, compuestos aromáticos, ingeniería metabólica, biotransformación, 4-hidroxifenilacetato.

Los principales resultados obtenidos durante el periodo objeto de esta memoria son los siguientes: a) Clonación y secuenciación de la ruta de degradación del ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA) de *Escherichia coli* W. Por vez primera se ha establecido una ruta completa de mineralización de un compuesto aromático en *E. coli* siendo además una de las pocas que se han caracterizado completamente en bacterias. b) Se ha caracterizado a nivel molecular una enzima con actividad de 3-hidroxi-4-hidroxifenilacetato hidroxilasa que está compuesta por dos subunidades y que constituye la primera enzima representante de una nueva familia de monooxigenasas que ha sido secuenciada hasta la fecha. Esta enzima posee la propiedad de utilizar un amplio rango de sustratos entre los que se encuentra el fenol y la tirosina, originando catecol o dopamina, respectivamente, productos ambos de gran interés industrial. c) Utilizando el grupo de genes que constituyen la ruta de mineralización del 4-HPA se ha construido un casete metabólico dentro de un minitransposón que es capaz de conferir a otras bacterias la propiedad de utilizar el 4-HPA como fuente de carbono y energía. d) De la misma manera se ha construido un minitransposón que contiene el operón *hpaBC* que codifica para la hidroxilasa de 4-HPA y que transferido a *Pseudomonas putida* le confiere la propiedad de biodegradar fenol.

Para los próximos años nos proponemos determinar las rutas catabólicas de los ácidos fenilacético, fenilpropiónico y 3-hidroxifenilpropiónico de *E. coli*, completando así un estudio que pretende demostrar que *E. coli* contiene rutas de mineralización de compuestos aromáticos de una complejidad similar a las descritas en bacterias del género *Pseudomonas*, prototipos de bacterias del suelo. Estos trabajos permitirán construir distintos casetes catabólicos funcionales de amplio espectro de huésped que servirán de base para expandir o construir rutas catabólicas de compuestos altamente tóxicos o contaminantes como el estireno o algunos detergentes. Por último, se estudiarán los distintos regulado-

ways which have been completely characterized at a molecular level in bacteria. b) We have characterized an enzyme showing a 3-hydroxy-4-hydroxyphenylacetate hydroxylase activity that is built of two dissimilar subunits and represents the first member of a new family of monooxygenases. This enzyme has a broad substrate range and is able to hydroxylate phenol and tyrosine, rendering catechol and dopamine, respectively, two important industrial products. c) We have constructed a mini transposon catabolic cassette containing the 4-HPA gene cluster that can be used to confer other bacteria the capacity to use 4-HPA as a carbon and energy source. d) Using the same methodology we have engineered a minitransposon containing the operon *hpaBC* encoding the 4-HPA hydroxylase that confers to *Pseudomonas putida* the capacity to mineralize phenol.

In the near future, our major aim will be to determine at a molecular level the catabolic pathways of phenylacetate, phenylpropionate, and 3-hydroxyphenylpropionate of *E. coli*, in order to demonstrate that this bacteria is endowed with a set of catabolic pathways for aromatic compounds that have a similar complexity to that found in analogous pathways of soil bacteria. These works will allow to construct different metabolic cassettes useful to expand or construct new catabolic pathways for the mineralization of toxic and contaminant compounds such as styrene or some detergents. We will also study the regulatory and transport mechanisms of the cloned catabolic pathways in order to construct regulatory circuits useful for the design of new biosensors as well as new circuits for the biological and/or gene containment of GMOs.

res y transportadores específicos de las rutas clonadas con objeto de construir circuitos de regulación útiles para obtener nuevos biosensores o para diseñar circuitos de contención genética y/o biológica de gran importancia para las cuestiones relativas a la bioseguridad de los GMOs (Organismo Genéticamente Modificado).

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- DGICYT, PB93-0115-C02-01 (1994-1997).
- CICYT, AMB94-1030-C02-02 (1994-1997).
- CAM, COR0070/94 (1994-1997).
- MEC, Acciones Integradas con Alemania N. 172.A (1995-1997).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Ana María Roa Arranz. Aplicación de nuevas estrategias bioquímicas y genéticas al estudio de la penicilina G acilasa de *Kluyvera citrophila*. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Directores: J.L. García López y C. Acebal.
- M^a Auxiliadora Prieto Jiménez. Caracterización molecular de la ruta catabólica del 4-hidroxifenilacetato de *Escherichia coli* W. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Director: J. L. García López.
- Ana I. Rodríguez Sánchez-Beato. Caracterización molecular de genes de *Clostridium acetobutylicum* y *Streptococcus pneumoniae* que codifican para proteínas con dominios de unión a colina. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 1995. Director: J. L. García López.
- Carlos Arrecubieta Larrañaga. Caracterización molecular de los genes capsulares de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 3. Universidad Complutense de Madrid, 1996. Directores: E. García López y R. López García.
- Ana Carmen Martín Rodríguez. Biología molecular del bacteriófago Cp-1 de *Streptococcus pneumoniae*. Universidad Complutense de Madrid, 1996. Director: P. García González.

Publicaciones/Publications

- Arrecubieta, C., García, E., and López, R. (1995). Sequence and transcriptional analysis of a DNA region involved in the production of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Gene* 167, 1-7.
- Calero, M., Méndez, E., and García, E. (1995). Expression of the human complex-forming glycoprotein HC (α 1-microglobulin) in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1249, 91-99.
- Fenoll, A., Muñoz, R., García, E., and G. de la Campa, A. (1995). Optochin sensitivity is encoded by the *atpC* gene of the *S. pneumoniae atp* (F_0F_1 H⁺-ATPase) operon. *Dev. Biol. Stand.* 85, 287-291.
- García, E., and López, R. (1995). *Streptococcus pneumoniae* type 3 encodes a protein highly similar to the human glutamate decarboxylase (GAD₆₅). *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 113-118.
- García, E., Arrecubieta, C., and López, R. (1995). Análisis molecular de los polisacáridos de bacterias Gram-positivas. In *Microbiología y Genética Molecular*, J. Casadesús, ed. (Universidad de Huelva Publ.), vol. 1, pp. 213-228.
- García, J.L., Roa, A., and Cortés, E. (1995). Las β -lactam acilasas. Una familia de enzimas con vocación industrial. In *Microbiología y Genética Molecular*, J. Casadesús, ed. (Universidad de Huelva Publ.), vol. 1, pp. 59-84.
- López, R., García, E., García, P., and García, J. L. (1995). Architecture and domain interchange of the pneumococcal cell wall lytic enzymes. *Dev. Biol. Stand.* 85, 273-281.

- López, R., Martín, A.C., and García, P. (1995). Bacteriófagos de neumococo: aportaciones al estudio de la biología molecular de *Streptococcus pneumoniae*. In Microbiología y Genética Molecular, J. Casadesús, ed. (Universidad de Huelva Publ.), vol. 1, pp. 191-212.
- Martín, A.C., López, R., and García, P. (1995). Nucleotide sequence and transcription of the left early region of *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-1 coding for the terminal protein and the DNA polymerase. *Virology* 211, 21-32.
- Martín, B., García, P., Castanié, M.-P., and Claverys, J.-P. (1995). The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* 15, 367-379.
- Martín, B., García, P., Castanié, M.-P., Glise, B., and Claverys, J.-P. (1995). The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls a SOS regulon. *Dev. Biol. Stand.* 85, 293-300.
- Martín, L., Prieto, M.A., Cortés, E., and García, J.L. (1995). Cloning and sequencing of the *pac* gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 287-292.
- Roa, A., Castellón, M.P., Goble, M.L., Virden, R., and García, J.L. (1995). New insights on the specificity of penicillin acylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 629-636.
- Sánchez-Beato, A.R., Ronda, C., and García, J.L. (1995). Tracking the evolution of bacterial choline binding domain: molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* gene. *J. Bacteriol.* 177, 1098-1103.
- Accardo, P., Sánchez-Corral, P., Criado, O., García, E., and Rodríguez de Córdoba, S. (1996). Binding of human complement component C4b-binding protein (C4BP) to *Streptococcus pyogenes* involves the C4b-binding site. *J. Immunol.* 157, 4935-4939.
- Alonso, J., and García, J.L. (1996). Proline iminopeptidase gene from *Xantomonas campestris* pv. *citri*. *Microbiology* 142, 2951-2957.
- Arrecubieta, C., García, E., and López, R. (1996). Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity in cell extracts of *Escherichia coli* expressing the pneumococcal *cap3A* gene required for the synthesis of type 3 capsular polysaccharide. *J. Bacteriol.* 178, 2971-2974.
- Arrecubieta, C., López, R., and García, E. (1996). Type 3-specific synthase of *Streptococcus pneumoniae* (Cap3B) directs type 3 polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* and in pneumococcal strains of different serotypes. *J. Exp. Med.* 184, 449-455.
- Díaz, E., Munthali, M., Lünsdorf, H., Höltje, J.-V., and Timmis, K.N. (1996). The two-step lysis system of pneumococcal bacteriophage EJ-1 is functional in Gram-negative bacteria: triggering the major pneumococcal autolysin in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 19, 667-681.
- García, E. (1996). On the misuse of the term 'lysozyme'. *Mol. Microbiol.* 21, 885.
- García, E., Arrecubieta, C., and López, R. (1996). The *lytA* gene and the DNA region located downstream of this gene are not involved in the formation of the type 3 capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*. *Curr. Microbiol.* 33, 133-135.
- Jaenecke, S., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., and Díaz, E. (1996). A stringently controlled expression system for analysing lateral gene transfer between bacteria. *Mol. Microbiol.* 21, 293-300.
- Martín, A.C., Blanco, L., García, P., Salas, M., and Méndez, J. (1996). *In vitro* protein-primed initiation of pneumococcal phage Cp-1 DNA replication occurs at the third 3' nucleotide of the linear template: a stepwise sliding-back mechanism. *J. Mol. Biol.* 260, 369-377.
- Martín, A.C., López, R., and García, P. (1996). Analysis of the complete nucleotide sequence and functional organization of the genome of *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-1. *J. Virol.* 70, 3678-3687.
- Muñoz, R., García, E., and G. de la Campa, A. (1996). Quinine specifically inhibits the proteolipid subunit of the F₀F₁ H⁺-ATPase of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 178, 2455-2458.
- Prieto, M.A., Díaz, E., and García, J.L. (1996). Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.* 178, 111-120.

- Roa, A., Globe, M.L., García, J.L., Acebal, C., and Virden, R. (1996). Rapid burst kinetic in the hydrolysis of 4-nitrophenylacetate by penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*: effects of mutation F360V on rate constants for acylation and de-acylation. *Biochem. J.* **316**, 409-412.
- Sánchez-Beato, A.R., and García, J.L. (1996). Molecular characterization of a family of choline-binding proteins of *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052. Evolution and gene redundancy in prokaryotic cell. *Gene* **180**, 13-21.
- Sanz, J.M., García, P., and García, J.L. (1996). Construction of a multifunctional pneumococcal murein hydrolase by module assembly. *Eur. J. Biochem.* **235**, 601-605.
- Sheehan, M.M., García, J.L., López, R., and García, P. (1996). Analysis of the catalytic domain of the lysin of lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**, 23-28.
- Usobiaga, P., Medrano, F.J., Gasset, M., García, J.L., Saiz, J.L., Rivas, G., Laynez, J., and Menéndez, M. (1996). Structural organization of the major autolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 6832-6838.

Próximos Artículos/Forthcoming Papers

- De la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A., and Muñoz, R. Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin sensitivity, coumarin sensitivity and quinolone resistance. *Microb. Drug Resist.* (en prensa, 1997).
- García, E., and López, R. Molecular biology of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* (en prensa, 1997).
- García, E., Arrecubieta, C., Muñoz, R., Mollerach, M., and López, R. A functional analysis of the *Streptococcus pneumoniae* genes involved in the synthesis of type 1 and type 3 capsular polysaccharides. *Microb. Drug Resist.* (en prensa, 1997).
- García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., and López, R. Versatility of choline-binding proteins. *Microb. Drug Resist.* (en prensa, 1997).
- García, P., Martín, A.C., and López, R. Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*: a molecular approach. *Microb. Drug Resist.* (en prensa, 1997).
- López, R., García, E., García, P., and García, J. L. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? *Microb. Drug Resist.* (en prensa, 1997).

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

MIGUEL ÁNGEL PEÑALVA SOTO

Jefe de Grupo/Group Leader

MARÍA TERESA SUÁREZ GONZÁLEZ

Investigadores/Senior Investigators

JOSÉ MANUEL FERNÁNDEZ CAÑÓN

EDUARDO A. ESPESO FERNÁNDEZ

MARGARITA OREJAS SUÁREZ (HASTA I-1996)

Investigadores Asociados/Associate Researchers

TOMÁS RONCAL MARTÍNEZ (HASTA XI-1996)

B. Postdoctoral/Postdoctoral Fellow

ELIECER DÍEZ HERNÁNDEZ (DESDE XI-1996)

MARÍA DEL CARMEN ESTÉBANEZ OSORIO (DESDE XII-1996)

JOSÉ MANUEL MINGOT ASCENÇÃO

BEATRIZ PÉREZ ESTEBAN (HASTA IV-1995)

B. Predoctorales/Graduate Students

ELENA REOYO HERNÁNDEZ

Personal Técnico/Technical Staff

I. Activación proteolítica del factor de transcripción PacC

Las enzimas extracelulares y otras moléculas expuestas al ambiente sintetizadas por los mohos están sujetas a las variaciones de pH ambiental. Existe un mecanismo regulador que asegura que su síntesis se produzca sólo cuando el pH ambiental está en el rango de valores en el que dichas moléculas son activas, permitiendo, por ejemplo, la síntesis de fosfatasa ácida sólo cuando el pH ambiental es ácido. La regulación por pH ambiental sólo se ha caracterizado en detalle a nivel molecular y genético en el eucariota simple *Aspergillus nidulans*. Dicha caracterización ha sido por el trabajo coordinado del grupo del Prof. Arst (Royal Postgraduate Medical School) y el de nuestro grupo. Dicha regulación está mediada por el factor de transcripción PacC, que se une al DNA a tra-

I. Proteolytic activation of the PacC transcription factor

Molds synthesize and secrete to the environment extracellular enzymes and other molecules which are exposed to ambient pH. A regulatory system exists ensuring that the synthesis of these molecules occurs only in the range of ambient pH values that is close to their corresponding pH optima. This mechanism ensures, for example, the synthesis of acidic phosphatase only under acidic ambient conditions. pH regulation has been characterized in great detail at the molecular and genetic level only in the lower eukaryote *Aspergillus nidulans* by the collaborative work of Prof. Arst's laboratory (Royal Postgraduate Medical School) and our own group. pH regulation is mediated by the PacC zinc-finger transcription factor, whose mode of binding to its cognate target in DNA is currently being studied in detail. The PacC primary trans-

vés de tres dedos de zinc. La unión de PacC al DNA está estudiándose en gran detalle a nivel bioquímico y genético molecular. PacC, cuyo producto primario de traducción (678 residuos) es inactivo en la regulación de los genes estructurales, se activa en respuesta a un medio ambiente alcalino mediante la eliminación proteolítica de más de 400 aminoácidos de su parte C-terminal. La proteína procesada (260 residuos, aprox.) es activa en la regulación de los genes estructurales, actuando como un represor de los genes "ácidos" y como un activador de los genes "alcalinos". Nuestro interés se centra en el mecanismo de activación de factores transcripcionales por proteólisis limitada en respuesta a estímulos externos. El grupo de proteínas reguladoras que se activa de esta manera está adquiriendo continuamente mayor relevancia, siendo el paradigma de dicho grupo el factor NF- κ B. Proponemos que gracias a las posibilidades de análisis genético-molecular y formal que ofrece el moho *Aspergillus*, PacC puede ser un modelo apropiado para el estudio de la activación proteolítica de los factores de transcripción.

II. Base molecular de la alcaptonuria

Se ha desarrollado en nuestro laboratorio el uso del moho *Aspergillus nidulans* como organismo accesorio para el estudio de metabolopatías congénitas humanas en el catabolismo de la fenilalanina. Mediante este modelo hemos clonado y caracterizado, en colaboración con el grupo del Dr. S. Rodríguez de Córdoba en el CIB, el gen humano responsable de la alcaptonuria (AKU; McKusick 203500); una enfermedad monogénica recesiva en la que la deficiencia de una enzima del catabolismo de la tirosina (la homogentísico dioxigenasa) causada por mutaciones de pérdida de función en el correspondiente gen estructural produce la acumulación de ácido homogentísico. En la actualidad estamos estudiando junto con el grupo del Dr. Rodríguez de Córdoba los mecanismos que regulan la expresión del gen de la homogentísico dioxigenasa y caracterizando mutaciones en este gen en pacientes AKU de distintas poblaciones y grupos étnicos. La alcaptonuria tiene, además de su interés clínico, un enorme interés histórico, al ser el primer error congénito del metabolismo descrito por Sir Archibald Garrod a principios de siglo y haber representado una evidencia importante para la hipótesis "un gen-un enzima" de Beadle y Tatum.

*lation product (678 residues) is inactive in structural gene regulation. In response to ambient alkaline pH, PacC is converted to a functional version by proteolytic elimination of more than 400 residues at the C-terminal side of the protein. The resulting polypeptide (~ residues 1-260) is active in structural gene regulation, being a repressor for "acidic" genes and a transcriptional activator for "alkaline" genes. We are interested in the activation of transcription factors by limited proteolysis in response to environmental stimuli. The number of transcription factors whose activity is regulated by such mechanism is steadily growing, being the prototype of this group NF- κ B. We propose that taking into account the sophisticated genetic and molecular techniques available in *A. nidulans*, PacC is a convenient model to study the activation of transcription factors by limited proteolysis.*

II. The molecular basis of alkaptonuria

*We have developed the use of the mold *Aspergillus nidulans* as a model organism to study inherited diseases of human phenylalanine catabolism. Using this model, we have cloned and characterized in collaboration with Dr. S. Rodríguez de Córdoba's group at the CIB, the human gene for alkaptonuria. Alkaptonuria (AKU; McKusick 203500), a monogenic recessive disorder, results from a deficiency in homogentisate dioxygenase, an enzyme of phenylalanine catabolism. We are currently studying with Dr. Rodríguez de Córdoba's group the expression of the homogentisate dioxygenase gene and characterizing AKU mutations in different populations and ethnic groups. In addition to its clinical relevance, AKU has notable historical interest, as it was the first inborn error in metabolism described by Sir Archibald Garrod at the beginning of the century and represented supportive evidence for Beadle and Tatum's "one gene-one enzyme" hypothesis.*

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, (Programa Nacional de Biotecnología) BIO94-0932. (1994-1997).
- E.C., D.G. XII, Biotech BIO2-CT93-0174. (1993-1996).
- E.C., D.G. XII, Biotech BIO4-CT96-0535. (1997-2000).
- Antibióticos S.A. (1993-1996).
- Fundación José Antonio de Castro. (1996).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Beatriz Pérez Esteban. Estudio de la regulación de un gen del metabolismo secundario de *Aspergillus nidulans* mediante el uso de fusiones a *lacZ*. Universidad Autónoma de Madrid. 1995. Director: Miguel Ángel Peñalva.

Publicaciones/Publications

- Espeso, E.A., Fernández-Cañón, J.M., and Peñalva, M.A. (1995). Carbon regulation of penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*: a minor effect of mutations in *creB* and *creC*. FEMS Microbiol. Lett. 126, 63-68.
- Fernández-Cañón, J.M., and Peñalva, M.A. (1995). Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 246, 110-118.
- Fernández-Cañón, J.M., and Peñalva, M.A. (1995). Fungal metabolic model for type I hereditary tyrosinaemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9132-9136.
- Fernández-Cañón, J.M., and Peñalva, M.A. (1995). Molecular characterization of a gene encoding a homogentisate dioxygenase from *Aspergillus nidulans* and identification of its human and plant homologues. J. Biol. Chem. 270, 21199-21205.
- Orejas, M., Espeso, E., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H.N., Jr., and Peñalva, M.A. (1995). Response to alkaline ambient pH involves C-terminal proteolysis of the *Aspergillus* PacC transcription factor. Genes & Devel. 9, 1622-1632.
- Pérez-Esteban, B., Gómez-Pardo, E., and Peñalva, M.A. (1995). A *lacZ* reporter fusion method for the genetic analysis of regulatory mutations in pathways of fungal secondary metabolism, and its application to the *Aspergillus nidulans* penicillin pathway. J. Bacteriol. 177, 6069-6076.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A., and Arst, Jr. H.N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. EMBO J. 14, 779-790.
- Espeso, E.A., and Peñalva, M.A. (1996). Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC-zinc finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthase gene promoter. J. Biol. Chem. 271, 28825-28830.
- Fernández-Cañón, J.M., Granadino, B., Beltrán-Valero, D., Renedo, M., Fernández-Ruiz, M., Peñalva, M.A., and Rodríguez de Córdoba, S. (1996). The molecular basis of alkaptonuria. Nature Genet. 14, 19-24.
- Suárez, T., and Peñalva, M.A. (1996). Characterisation of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB*-*pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. Mol. Microbiol. 20, 529-540.

Genética Molecular de *Pseudomonas* *Molecular Genetics of Pseudomonas*

VÍCTOR DE LORENZO PRIETO
Jefe de Grupo/*Group Leader*
Investigador/*Senior Investigator*

GIOVANNI BERTONI
Investigador Asociado/*Associate Research*

JOSÉ PÉREZ MARTÍN
ÁNGEL CEBOLLA RAMÍREZ
CAROLINA SOUSA MARTÍN
B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

AMPARO HARO CASTUERA
ILDEFONSO CASES DÍAZ
LUCIA ESCOLAR BLASCO
B. Predoctorales/*Graduate Students*

I. 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 algunas de 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 contami-

I. 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

nantes 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, 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. A lo largo de este año hemos dilucidado parte del mecanismo de activación del regulador XylR en presencia de xilenos.

II. Ingeniería metabólica de rutas degradativas para compuestos cloro-aromáticos

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 cloro benzoatos, deteniendo se en ese punto el proceso biodegradativo. En otros casos, algunas 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 cuellos 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, o bien para aumentar su biodisponibilidad a base de combinar genes de biodegradación con genes de producción de compuestos tensioactivos.

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 pre-determined chemical species and their coupling to optical and immunological detection systems. During this year, we have ascertained in part the mechanism of activation of the regulatory protein XylR by aromatic effectors such as xylenes.

II. 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 or for enhancing the bioavailability by combining biodegradation genes with those for production of tensioactive agents.

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, BIO92-1018-CO2-1. (1993-1995).
- CE, BIOTECH BIO2-CT92-0084. (1992-1995).
- REPSOL-Instituto Nacional de Hidrocarburos.

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Silvia Fernández. Análisis genético de la activación del promotor Pu del plásmido TOL por la proteína XylR de *Pseudomonas putida*. Universidad Autónoma de Madrid, 1995. Director: V. de Lorenzo.

Publicaciones/Publications

- Brazil, D., Kenefick, L., Callanan, M., Haro, A., de Lorenzo, V., Dowling, D.N., and O'Gara, F. (1995). Construction of a rhizosphere *Pseudomonad* with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph* gene expression in the rhizosphere. *App. Env. Microbiol.* 61, 1946-1952.
- De Lorenzo, V. (1995). Biotecnología medioambiental: Nuevos abordajes biológicos al problema de los residuos industriales. En *La Biotecnología y su aplicación industrial en España*. Eds: J. L. Carrascosa y A. Modrego. pp. 123-130. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Fernández, S., de Lorenzo, V., and Pérez-Martín, J. (1995). Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol. Microbiol.* 16, 205-213.
- Kristensen, C., Eberl, L., Sánchez-Romero, J.M., Giskov, M., Molin, S., and de Lorenzo, V. (1995). Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J. Bacteriol.* 177, 52-58.
- Martínez, J.L., and de Lorenzo, V. (1995). Molecular strategies of iron acquisition by bacteria: The Fur protein and the aerobactin case history (J. Abadía, Ed) *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 335-34
- Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V. (1995). Integration Host Factor (IHF) supresses promiscuous activation of the σ^{54} -dependent promoter Pu of *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7277-7281.
- Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V. (1995). Las estructuras del ADN como elementos auxiliares en la regulación de la transcripción. En *Microbiología y Genética Molecular*: Ed.: J. Casadesús. pp. 173-189. Sociedad Española de Microbiología y Servicio de Publicaciones de la Universidad de Huelva.
- Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V. (1995). The N-terminal domain of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR is a specific intramolecular repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9392-9396.
- Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V., (1995). The σ^{54} -dependent promoter Ps of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* requires HU for transcriptional activation in vivo by XylR. *J. Bacteriol.* 177, 3758-3763.
- Calb, R., Davidovitch, A., Koby, S., Giladi, H., Goldenberg, D., Margalit, H., Holtel, A., Timmis, K., Sánchez-Romero, J.M., de Lorenzo, V., and Oppenheim, A.B. (1996). Structure and function of the *Pseudomonas putida* integration host factor. *J. Bacteriol.* 178, 6319-6326.
- Cases, I., de Lorenzo, V., and Pérez-Martín, J. (1996). Involvement of sigma factor σ^{54} in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid Pu promoter. *Mol. Microbiol.* 19, 7-17.
- Cebolla, A., Guzmán, C. and de Lorenzo, V. (1996). Non-disruptive detection of activity of catabolic promoters of *Pseudomonas* with an antigenic surface reporter system. *App. Env. Microbiol.* 62, 214-220.

- De Lorenzo, V., and Pérez-Martín, J. (1996). Regulatory noise in prokaryotic promoters: How bacteria learn to respond to novel environmental signals. *Mol. Microbiol.* **19**, 1177-1184.
- Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V. (1996). Identification of the repressor subdomain within the signal reception module of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR of *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* **271**, 7899-7902.
- Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V. (1996). In vitro activities of an N-terminal truncated form of XylR, a σ^{54} -dependent transcriptional activator of *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.* **258**, 575-587.
- Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V. (1996). Physical and functional analysis of the prokaryotic enhancer of the σ^{54} -promoters of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.* **258**, 562-574.
- Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V., (1996). ATP binding to the σ^{54} -dependent activator XylR triggers a protein multimerization cycle catalysed by UAS DNA. *Cell* **86**, 331-339.
- Tzchaschel, B., Klee, S., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., and Guzmán, C. (1996). Towards a vaccine candidate against *Shigella dysenteriae* 1: expression of the Shiga toxin B subunit in an attenuated *Shigella flexneri aroD* carrier strain. *Microbial Pathog.* **21**, 277-288.

Replicación y Estabilidad de Plásmidos en Bacterias Gram-negativas

Replication and Stability of Plasmids in Gram-negative Bacteria

RAMÓN DÍAZ OREJAS
ELENA FERNÁNDEZ-TRESGUERRES
GERTRUDIS DE TORRONTÉGUI
Jefes de Grupo/*Group Leaders*
Investigadores/*Senior Investigators*

RAFAEL GIRALDO SUÁREZ
Investigador Asociado/*Associate Research*

DARIO GARCÍA DE VIEDMA (HASTA XI-1995)
B. Postdoctorales/*Postdoctoral Fellows*

GUILLERMO DE LA CUEVA MÉNDEZ
JOSÉ IGNACIO ESPINOSA BALLESTEROS (DESDE XI-1995)
BEATRIZ MAESTRO GARCÍA-DONAS
JUAN MANUEL SÁNCHEZ ROMERO (HASTA XII-1995)
SANDRA SANTOS SIERRA (DESDE X-1996)
B. Predoctorales/*Graduate Students*

CONSUELO PARDO ABARRIO
ANA M^a. SERRANO LÓPEZ
Personal Técnico/*Technical Staff*

Replicación y estabilidad de plásmidos en bacterias Gram-negativas

Palabras clave: Plásmidos bacterianos, replicación del ADN, iniciadores de replicación, inhibidores de replicación, regulación transcripcional, sistemas de estabilidad, muerte condicional.

En nuestro grupo se trabaja en el estudio de la replicación y el mantenimiento de la información genética utilizando plásmidos bacterianos como sistemas modelo. En estos estudios se utiliza una combinación de técnicas genéticas bioquímicas y biofísicas con el fin de establecer correlaciones estructura-función.

Los estudios de replicación del ADN se realizan sobre el plásmido bacteriano pPS10 (Fig. A) y tienen como objetivo principal entender las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN que modulan el inicio de replicación de este plásmido. En particular estudiamos el papel que desempeña la

Replication and stability of plasmids in Gram-negative bacteria

Key words: Bacterial plasmids, DNA replication, initiators of DNA replication, inhibitors of DNA replication, transcriptional regulation, plasmid stability systems, conditional cell-death programs.

We are studying the replication and maintenance of the genetic information in bacterial cells using plasmids as model systems. We use a combination of genetic, biochemical and biophysical techniques to establish a correlation between structure and function.

We use the bacterial plasmid pPS10 as model system in the replication studies to get information on the molecular interactions that modulate initiation of plasmid pPS10 replication (Fig. A). For this purpose we analyze the role of the RepA protein, that is a bifunctional protein: it is an specific initiator of pPS10 replication and it is a transcriptional regulator of its own synthesis.

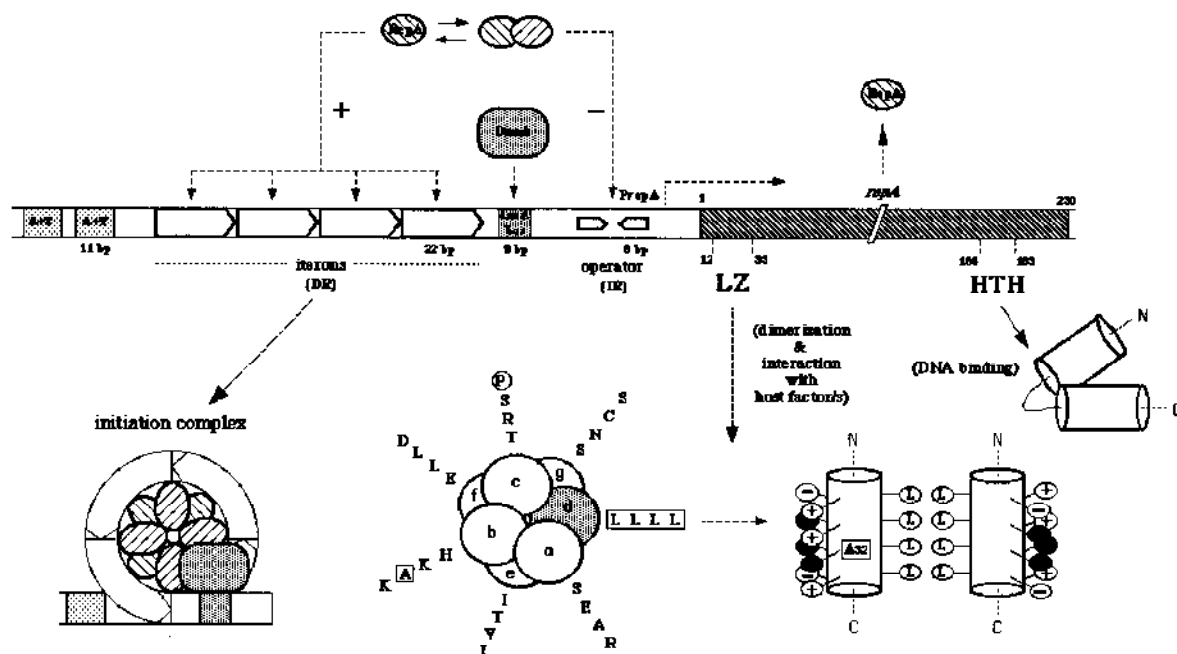
proteína RepA que es a la vez un iniciador específico de la replicación de pPS10 y un regulador transcripcional de su propia síntesis. Se analizan los motivos/dominios de interacción proteína-proteína (LZ) y proteína-ADN (HTH) en este iniciador, las secuencias de ADN con las que interacciona (cuatro iterones del origen de replicación y una repetición invertida del promotor del gen *repA*), los cambios conformacionales en RepA implicadas en el reconocimiento diferencial del origen de replicación y del promotor del gen *repA* y los complejos nucleoproteicos que resultan de dichas interacciones. Se pretende obtener información estructural detallada de los complejos RepA/ADN. Así mismo se estudian las interacciones de RepA con otras proteínas de replicación del huésped y su papel en la formación del complejo iniciador, analizando su contribución a la determinación del rango de huésped de pPS10. Para este último análisis se cuenta con una colección de mutantes de RepA que extienden el rango de huésped de pPS10 a *Escherichia coli*.

Los estudios sobre mantenimiento de la información genética se centran en el sistema *parD* (Fig. B), un sistema de estabilidad de plásmidos que hemos encontrado en el factor de resistencia a antibióticos R1 y que actúa introduciendo un esquema de muerte condicional en las células que pierden el plásmido durante la división celular. El sistema *parD* es un operon bicistrónico, que codifica para un veneno (proteína Kid) y un antídoto inestable (proteína Kis) y que está regulado transcripcionalmente por la acción coordinada de estas dos proteínas. El veneno actúa inhibiendo eficientemente la replicación del ADN a nivel de la principal helicasa replicativa, proteína DnaB. El antídoto actúan interaccionando físicamente con el veneno y formando un complejo estable con él. Nuestros estudios sobre el veneno del sistema *parD*, proteína Kid, se centran en elucidar el mecanismo inhibitorio de replicación del veneno, las interacciones proteína-proteína implicadas en esta inhibición y el rango de acción del inhibidor. Los estudios sobre el antídoto del sistema *parD*, proteína Kis, tienen como objetivo analizar su interacción con el veneno, las secuencias implicadas en la interacción antídoto-veneno y el papel de estas interacciones en la regulación de la actividad del veneno y en la formación del complejo que reprime la expresión del sistema.

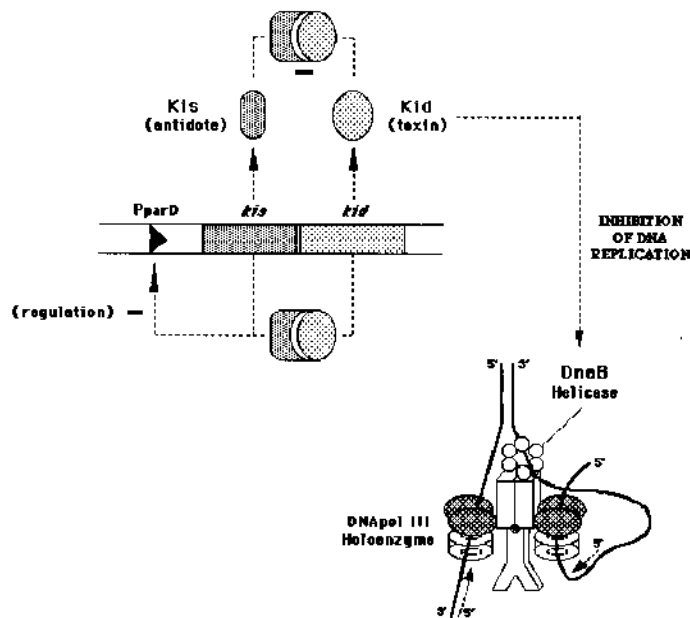
We analyze the motifs/domains in RepA involved in the protein-protein and protein-DNA interactions (LZ and HTH respectively). We also analyze the plasmid sequences targeted by RepA (four iterons in the origin of replication and one inverted repeat in the repA promoter region), the different conformations of RepA involved in the interactions with these sequences, and the nucleoprotein complexes that result. We aim to obtain a detailed structural information on the RepA/DNA complexes. We also study the interactions of RepA with other proteins of the replication machinery of the host and their role in the formation of the initiation complex. The role of these interactions in the determination of the plasmid host-range are also studied analyzing a collection of RepA mutants that expand the host range of pPS10 to Escherichia coli.

*The studies on the maintenance of the genetic information are centered in the stability system *parD* of plasmid R1 (Fig. B). The *parD* system is a bicistronic operon coding for a killer determinant, Kid, and for an unstable protein, Kis, that suppresses the action of Kid. This system stabilizes the plasmid inheritance introducing a conditional death program in the cells that lose the plasmid at cell division. The death program is based in the balance of the Kid and Kis proteins and in the relative instability of the Kis antidote. The killer determinant, Kid, is an efficient inhibitor of DNA replication acting at the DnaB helicase level and the antidote, Kis, interacts physically with Kid forming a stable complex. Our studies on the Kid protein aim to clarify its mechanism of inhibition of DNA replication and to understand the protein-protein interactions involved and the host range of this inhibitor. The studies on the antidote of the *parD* system, protein Kis, aim to evaluate its interaction with the Killer protein, to identify the sequences involved in the interaction and to understand the role of this interaction in the formation of the complex that represses transcription of the *parD* operon.*

A) Protein-DNA & protein-protein interactions in *Pseudomonas* pPS10 replicon



B) Kis & Kid proteins in the inhibition of DNA replication by *ParD* system



Organismos Financiadores/*Funding Agencies*

- CICYT, BIO94-0707. (1994-1997).
- DGICYT, PB94-0127. (1995-1998).

Publicaciones/*Publications*

- De Torrontegui, G., Tresguerres, M.E.F. y Díaz Orejas, R. (1995). Replicación, rango de huésped y mantenimiento de plásmidos en bacterias Gram-negativas: estudios con pPS10, un plásmido de *Pseudomonas* y con R1, un factor de resistencia a antibióticos en enterobacterias. En: *Microbiología y Genética Molecular*, (Ed. J. Casadesús), Servicio Publ. Universidad de Huelva, pp. 721-749.
- Fernández-Tresguerres, M.E., Martín, M., García de Viedma, D., Giraldo, R., and Díaz-Orejas, R. (1995). Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range. *J. Bacteriol.* **177**, 4377-4384.
- García de Viedma, D. Serrano-López, A., and Díaz-Orejas, R. (1995). Specific binding of the replication protein of plasmid pPS10 to direct and inverted repeats is mediated by an HTH motif. *Nucleic Acids Res.* **23**, 5048-5054.
- García de Viedma, D., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Lurz, R., and Díaz-Orejas, R. (1995). Transcription of repA, the gene of the initiation protein of the *Pseudomonas* plasmid pPS10, is autoregulated by interactions of the RepA protein at a symmetrical operator. *J. Mol. Biol.* **247**, 211-223.
- Jensen, R.B., Grohmann, E., Schwab, H., Díaz-Orejas, R. and Gerdes, K. (1995). Comparison of ccd of F, parDE of RP4 and parD of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1. *Mol. Microbiol.* **17**, 211-220.
- Ruiz-Echevarría, M.J., de la Cueva, G., and Díaz-Orejas, R. (1995). Translational coupling and limited degradation of a polycistronic messenger modulate differential gene expression in the parD stability system of plasmid R1. *Mol. Gen. Genetics.* **248**, 599-609.
- Ruiz-Echevarría, M.J., de la Torre, M. A., and Díaz-Orejas, R. (1995). A mutation that decreases the efficiency of plasmid R1 replication leads to the activation of parD, a killer stability system of the plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**, 129-136.
- Ruiz-Echevarría, M.J., Giménez-Gallego, G., Sabariegos-Jareño, R., and Díaz-Orejas, R. (1995). Kid, 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.* **247**, 568-577.
- Del Solar, G., Alonso, J.C., Espinosa, M., and Díaz-Orejas, R. (1996). Broad host range replication: an open question. *Mol. Microbiol.* **21**, 661-666.
- García de Viedma, D., Giraldo, R., Tresguerres, M.E., and Díaz-Orejas, R. (1996). A leucine-zipper motif determines different functions in a DNA replication protein. *EMBO J.* **15**, 925-934.

Biología Molecular de Hongos Basidiomicetos

Molecular Biology of Basidiomycete Fungi

ALDO E. GONZÁLEZ BECERRA

Jefe de Grupo/Group Leader

Investigador/Senior Investigator

ANA M^a CALVO (HASTA III-1996)

TANIA GONZÁLEZ DÍAZ DE VILLEGAS

ANA I. LÓPEZ-ARCHILLA (HASTA XII-95)

MARIANA MANSUR (HASTA VI-1996)

ERNESTO ZAPICO FERNÁNDEZ

M^a DEL CARMEN TERRÓN (HASTA IX-1995)

SUSANA YAGÜE PLAZA

B. Predoctorales/Graduate Students

MARÍA HEDENMO

Pregraduado/Undergraduate Student

Palabras clave: Basidiomicetos, genes, enzimas, biodegradación, expresión.

Los basidiomicetos de podredumbre blanca tienen un complejo mecanismo que involucra enzimas que atacan directamente a la lignina, tales como, lignina peroxidasa (LiP), Manganese peroxidasa (MnP) y lacasas. También tienen enzimas que producen peróxido de hidrógeno para ayudar a la acción catalítica de las peroxidases (por ejemplo: glucosa oxidasa y glioxal oxidasa), enzimas que pueden participar en la ruptura de los fenoles, aldehídos, otros derivados de la lignina (por ejemplo: quinona reductasa) o hidrocarburos aromáticos policíclicos, enzimas necesarias para prevenir la eventual acumulación excesiva de H₂O₂ y también, las enzimas pertenecientes a los ciclos redox de las hidroquinonas (por ejemplo: catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa). Sin embargo, los estudios de las oxidases y más importante aún de las lacasas y MnP, parecen poseer un mayor interés al haberse demostrado su actividad ligninolítica una vez purificadas.

Keywords: Basidiomycetes, genes, enzymes, biodegradation, expression.

White-rot basidiomycetes have a complex mechanism involving enzymes that attack lignin directly, such as, lignin peroxidase (LiP), Manganese peroxidase (MnP) and laccases. Also they have enzymes supplying hydrogen peroxide to help the catalytic action of peroxidases. (i.e., glucose oxidase and glyoxal oxidase), enzymes that can participate in the breakdown of phenols, aldehydes, other lignin derivatives (i.e., quinone reductase) or polycyclic aromatic hydrocarbons, enzymes that are needed to prevent eventual excessive accumulation of H₂O₂ and also, the enzymes belonging to the redox hydroquinone cycles (i.e., catalase, superoxide dismutase, glutathion peroxidase). However, the study of oxidases, and most important the laccases and MnP, seems to hold a greater interest because of their already proved ligninolytic activity in their purified form.

Recent work of our laboratory has been focused to the study of oxidative enzymes from supernatants of submerged cultures of the before selected fungi. The first results demonstrated the exis-

El trabajo reciente de nuestro laboratorio se ha orientado al estudio de las enzimas oxidativas presentes en los sobrenadantes de los cultivos sumergidos de los hongos seleccionados en la etapa anterior. Los primeros resultados demostraron la presencia de una familia de isoenzimas de lacasas y MnP presentes a diferentes tiempos en la cinéticas realizadas frente a sustratos conteniendo álcali ligninas procedentes de efluentes industriales de la fabricación de pulpa de papel. Las enzimas fueron aisladas, purificadas y se determinó la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal con vista a construir oligonucleótidos y su posterior amplificación para obtener sondas. La segunda estrategia más simple y directa para el aislamiento de los genes que codifican para estas enzimas ha sido utilizar sondas heterólogas correspondientes a los genes previamente aislados y secuenciados de otros hongos ligninolíticos, como *Coriolus hirsutus*, *Phlebia radiata*, PMI basidiomiceto, *Trametes versicolor* o *Trametes villosa*. Esta investigación de nuestro laboratorio nos ha conducido a la detección, aislamiento, clonaje y secuenciación de una familia de genes que codifican lacasa y Manganese peroxidase (*mnp*). El aislamiento y clonaje de cinco genes de lacasa de un posible número de ocho presentes en dos cepas que degradan lignina y algunos de sus derivados, es una base importante para estudiar sus mecanismos de regulación. Se han construido genotecas parciales utilizando plásmidos o genotecas genómicas totales mediante cósmidos.

En los caldos de cultivo y utilizando análisis *Northern* se han puesto en marcha los estudios de regulación de la transcripción frente a diferentes fuentes de C y N, pH e inductores, demostrando que la expresión de esta familia de genes está regulada de forma diferencial e influenciada por los parámetros estudiados.

En una segunda línea de trabajo las cepas y/o sus enzimas se han ensayado frente a efluentes de otro tipo de industrias (azucarera, papelera en base a bagazo de caña de azúcar, cervecera, etc.) con interesantes resultados en la disminución de la DBO y en la expresión de las actividades reguladas por los genes en estudio. Se han caracterizado los sustratos transformados por los hongos en las cinéticas en cultivo sumergido y fermentación en estado sólido. Estos trabajos se llevan a cabo en colaboración con laboratorios de Cuba, México e Italia.

tence of a laccase isoenzyme family and MnP, detected at different times in the kinetics using substrates with alkalilignins from pulp and paper industry effluents. The enzymes were isolated, purified and identified the aminoacid N-terminal sequence, to construct oligonucleotides subsequently amplified to obtain probes. The second most direct and simple strategy for isolating the gene encoding these enzymes has been the use heterologous gene probes corresponding to the genes previously isolated and sequenced from other ligninolytic fungi, namely, genes from *Coriolus hirsutus*, *Phlebia radiata*, PMI basidiomycete, *Trametes versicolor* or *Trametes villosa*. This research of our laboratory has led us to detection, isolation, cloning and sequentiation of a family of genes encoding laccase and Mn peroxidase (*mnp*). Isolation and cloning of five genes out of a possible number of eight genes from two strains degrading lignin and some of its derivatives, is an important basis for studying the regulatory mechanisms. Partial gene library constructed using plasmid vehicle or total genomic library using cosmids are being used.

The transcription regulation studies, using Northern analysis, have demonstrated the differential expression of this gene family under different parameters such as C and N sources, pH and activators.

In a second work line, the strains and/or their enzymes have been proved using effluents from another type of industry (sugarcane industry, pulp and paper production from sugarcane bagasse, and beer factory). In this way, they have been obtained interesting results like BOD reduction and enzymatic activity expression regulated by studied gene. The fungi degradation of substrates in submerged cultures and SSF has been characterized. These researches are developed in collaboration with laboratories from Cuba, México and Italy.

Our immediate goals are to determine the contribution of each gene to degradation mechanisms and to elucidate the reliable factors of expression regulation. The functional and molecular characterization of gene that we are realizing recently, must contribute to elucidate these questions.

We are searching about the production of new interesting oxidative enzymes produced by actinomycetes. This work is doing with a very strong collaboration with the Microbiology and Parasitology Department of the Alcalá University.

Las metas del futuro inmediato son determinar la contribución de cada gen a los mecanismos de degradación y cuales son los factores que ponen en marcha la regulación de la expresión. La caracterización a nivel funcional y molecular de los genes que hemos comenzado recientemente debe contribuir a dilucidar estas preguntas.

En estrecha cooperación con el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá estamos investigando la producción de nuevas e interesantes enzimas oxidativas producidas por actinomicetos.

Finalmente, nosotros hemos continuado las investigaciones con un grupo del CBM-CSIC, para aislar y caracterizar los hongos y levaduras que crecen en ambientes extremos (microorganismos acidófilos, termófilos y resistentes a metales).

Lastly, we have continued the investigations, with a group from CBM-CSIC, to isolate and characterize fungi and yeast which grow in extreme environments (acidophylic, thermophylic and metal resistant microorganisms).

Organismos Financiadores/Funding Agencies

- CICYT, BIO92-0357. (1992-1995).
- CICYT, BIO93-0662-CO4-01. (1993-1996).
- CE, Contract AGRE-CT90-0047-SMA. (1991-1995).
- CE, Contract FAIR-CT95-0805-DG 12. (1995-1998).
- CE, Programa ALFA, Project FUNGATECH Nº 2.037(6)-Project B1.
- Convenio CSIC-CNR (Italia). (1995-1996).
- Convenio Hispano-Cubano (CSIC-CECE). (1993-1995).
- Convenio Hispano-Mexicano (CSIC-CONACYT). (1995-1996).
- Convenio CSIC-ICC (International Center for Cancer & Development Biology-Chile. (1995-1996).
- CICYT, BIO95-2065-E. (1996-1997).
- CICYT, BIO96-1131-CO2-01. (1996-1997).
- CICYT, BIO96-1716-CE. (1996-1998).

Tesis Doctorales/Doctoral Theses

- Susana Yagüe Plaza. Aislamiento e identificación de levaduras en el proceso de fabricación de la cerveza. Universidad de Alcalá, 1995. Directores: María I. Pérez-Leblic y Aldo González
- María del Carmen Terrón Orellana. Caracterización del complejo lignocelulósico de la paja de trigo y su aplicación al análisis del efluente final de una industria papelera. Universidad de Alcalá de Henares, 1995. Director: Aldo González.
- Ana María Calvo Guerrero. Decoloración biológica de efluentes alcalinos de la industria papelera mediante hongos ligninolíticos. Universidad de Alcalá de Henares, 1995. Director: Aldo González.
- Mariana Mansur Iglesias. Caracterización bioquímica y molecular de las fenoloxidasas de hongos ligninolíticos. Universidad Autónoma de Madrid, 1996. Directores: Teresa Suárez y Aldo González.

Publications/Publications

- Calvo, A.M., Galletti, G.C., and González, A.E. (1995). Paper waste-water analyses by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry during biological decolorization with the fungi *Corioloopsis gallica* and *Paecilomyces variotii*. *J. Analyt. App. Pyrol.* **33**, 39-50.
- Calvo, A.M., Terrón, M.C., Fidalgo, M.L., Pelayo, J.M., Galletti, G.C., and González, A.E. (1995). Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry characterization of wheat straw alkaline-cooking effluents after biological treatment with the fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Ganoderma australe*. *Anal. Chim. Acta* **309**, 145-152.
- López-Archilla, A.I., Marín, I., González, A.E., and Amils, R. (1995). Identification of fungi from an acidophilic river. In *Fungal identification techniques Biotechnology*, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp 202-211.
- Martínez, A.T., Barrasa, J.M., Martínez, M.J., Almendros, G., Blanco, M., and González, A.E. (1995). *Ganoderma australe*: A fungus responsible for extensive delignification of some austral hardwoods. In *Ganoderma: Systematics, Phytopathology and Pharmacology*, Buchanan, P.K., Hseu, R.S. and Moncalvo, J.M. ed. (National Taiwan University, Taipei), pp. 67-77.
- Pal, M., Calvo, A.M., Terrón, M.C., and González, A.E. (1995). Solid State Fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and the white rot fungus *Trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotech.* **11**, 541-545.
- Terrón, M.C., Fidalgo, M.L., Galletti, G.C., and González, A.E. (1995). Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of milled wood lignin of two Chilean woods naturally decayed by *Ganoderma australe*, *Phlebia chrysocrea* and brown-rot fungus. *J. Anal. App. Pyrol.* **33**, 61-75.
- Calvo, A.M., Fernández-Larrea, J.B., Copa-Patiño, J.L., and González, A.E. (1996). Improvements in decolorization of paper effluents using ligninolytic fungi and possible enzymes involved. In: *Biotechnology in Pulp and Paper Industry*. Ed. E. Srebotnik & K. Messner. Viena, Austria. pp. 253-257.
- Mansur, M., Fernández, J.B., Hedenmo, M., Calvo, A.M., Copa-Patiño, J.L., and González, A.E. (1996). Detection and partial characterization of laccases produced by *Pleurotus* genus strain. *Biotechnology in Pulp and Paper Industry* de, E. Srebotnik & K. Messner. Viena, Austria. pp. 377-380.
- Terrón, M.C., Fidalgo, M.L., Galletti, G.C., and González, A.E. (1996). Comparative study of the lignin composition of seven Chilean woods using Py-GC-MS. In: *Biotechnology in Pulp and Paper Industry*. Eds. E.Srebotnik & K. Messner. Viena, Austria pp. 381-384.



Premios y Distinciones *Awards and Honours*

— **José Manuel Andreu, Germán Rivas, e Isabel Barasoain.**

El Proyecto Mecanismos Moleculares y Celulares de Acción de Taxoides del CIB, uno de los dos proyectos financiados en el Concurso 1995-96 de la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer.

— **Ignacio Arechaga Iturregui.**

Premio Extraordinario de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid. Director de Tesis: E. Rial.

— **Pedro Castañera Domínguez.**

Miembro del Comité Ejecutivo de la Conferencia Internacional *Technology Transfer in Biological Control from Research to Practice*. Organizadores: OILB/CILBA. Miembro del Comité Científico de la Asociación para la Gestión Integrada de Cultivos (AGROFUTURO).

— **Víctor de Lorenzo.**

Miembro del panel editorial de *The Journal of Bacteriology*. 1989-1997. Miembro electo de la EERO (*European Environmental Research Organization*).

— **Flora de Pablo.**

Visiting Associate. Division of Biology. California Institute of Technology. Pasadena, California, USA. Septiembre 1995-Junio 1996.

— **Consuelo de la Torre.**

Miembro de la *European Science and Technology Assembly*, órgano asesor de la Comisión de la Unión Europea. Bruselas, 1995-1996.

— **José Ramón Díaz-Ruiz.**

Miembro del Consejo Editorial de la Revista *Virología*, publicación oficial de la SEV, 1995 y 1996.

— **Manuel Espinosa.**

Chairman de la Red *Molecular Biology and Ecology of Plasmid-mediated Gene Spread*. *European Science Foundation*. 1994-1997. Miembro del Consejo Técnico del Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus (Instituto de Salud Carlos III). Desde 1995. Miembro del *International Advisory Board of the Meetings: Plasmid Biology 96*. Graz (Austria); *Genetic Exchange*. Siena (Italia). 1996. Elegido miembro de la *European Molecular Biology Organization (EMBO)*. Octubre. 1996.

— **Gonzalo Giménez-Martín.**

Profesor honorario de la Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. Director de la Sociedad Iberoamericana de Biología Celular. 1995-.

— **Santiago Lamas.**

Premio de la Fundación Renal "Iñigo Álvarez de Toledo" en su vertiente de investigación básica. Edición 1995. Premio "César Llamazares" de la Sociedad Española de Nefrología al mejor editorial publicado. Edición 1996.

— **Rubens López García.**

Miembro del Consejo Editorial de *FEMS Microbiol. Lett.*

— **Francisco Javier Medina Díaz.**

Miembro de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Biología Celular.

— **Eduardo Páez.**

Miembro del Consejo Editorial de la revista *Virología* (publicación oficial de la SEV).

— **B. Pérez-Villamil, Enrique J. de la Rosa, A. V. Morales y Flora de Pablo.**

II Premio a la Investigación Endocrinológica. Pharmacia y Soc. Española de Endocrinología. Pamplona. Junio 1995.

— **Eduardo Rial Zueco.**

Miembro del Consejo Editorial de *Molecular Membrane Biology* (Desde 1-1996).

— **María Carmen Risueño.**

Miembro de Honor de la Sociedad Española de Microscopía Electrónica. Miembro del *Life Sciences Working Group. Microgravity Advisory Committee.* Agencia Espacial Europea.

— **Paloma Sánchez-Aparicio.**

Premio Extraordinario de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, 1994-1995. Directora de Tesis: Ángeles García Pardo.

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

— **M^a Enriqueta Arias y Aldo González.**

Curso en la Universidad de Alcalá. "Biodegradación de la lignocelulosa: Aplicaciones Tecnológicas". Alcalá de Henares, Junio, 1996.

— **José Manuel Andreu.**

Chairman of Organizing Committee. European Conference Biophysics of Cytoskeleton. San Feliu de Guixols, Octubre, 1995.

— **Pedro J. Aparicio.**

Miembro del Comité Científico Asesor de la organización de los siguientes congresos:

European Symposium on Photomorphogenesis in Plants, Sitges, Barcelona, 9-13 de Julio de 1995.

UV/Blue light: Perception and Responses in Plants and Microorganisms, Philipps-Universität, Marburg, Alemania, 25-31 de Agosto de 1996.

International Symposium on Stress on Inorganic Nitrogen Assimilation & The 2nd Fohs Biostress Symposium, Moscú, 17-21 de Septiembre de 1996.

— **Ángela Casado Moragón.**

Curso de titulación propia en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense. "Técnicas inmunohematológicas y electroforéticas básicas". Madrid. Diciembre, 1995.

— **Pedro Castañera Domínguez.**

Moderador de la mesa redonda sobre "Control integrado de plagas y enfermedades" dentro del Curso Superior de Mejora Genética Vegetal, CIHEAM/IAMZ. Zaragoza.

— **Enrique J. de la Rosa.**

Coordinador del Curso de Doctorado del Dpto. de Biología Celular y del Desarrollo Proliferación y diferenciación celulares y desarrollo. 1995. Comité organizador del *Workshop* "Avances en Biología Molecular y Celular". Centro Nacional de Biotecnología. Diciembre, 1995 (III) y Diciembre, 1996 (IV).

— **Enrique J. de la Rosa y M. Carmen Risueño.**

Jornadas de Microscopía Confocal. Centro de Investigaciones Biológicas. Septiembre, 1996.

— **Rosario de la Torre Binimelis.**

Curso de Doctorado en el Hospital Universitario de San Carlos. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. "Radicales libres y envejecimiento". Madrid, Mayo, 1995 y Mayo, 1996.

— **José Ramón Díaz Ruz.**

Miembro Comité Científico del V Congreso Nacional de Virología. Santiago de Compostela, 1996.

— **José Luis Díez Cortes.**

Presidencia del Comité Organizador del *VIIIth. Balbiani Ring Workshop* Córdoba (Spain) Septiembre 16-19, 1995.

— **Manuel Espinosa.**

Curso Práctico sobre “Técnicas de Ingeniería Genética en Procariontes”, subvencionado por la Agencia Española de Cooperación Internacional. Universidad de Chile. Santiago de Chile, 10-23 de Diciembre de 1995.

— **Manuel Espinosa, Ricardo Maccioni, Ariel Orellana y Aldo González.**

Curso en la Universidad de Chile. “Biología Molecular de Procariontes”, Santiago, Chile Noviembre-Diciembre, 1995. Financiado por la AECI, Ministerio de Asuntos Exteriores.

— **Isabel Fabregat, María Carmen Risueño y Miguel Quintanilla.**

I Reunión de la Rama Española de la Sociedad Europea de Cultivo de Tejidos (ETCS). Facultad de Farmacia. UCM. Junio, 1995.

— **Gonzalo Giménez Martín y Juan F. Giménez Abián.**

Curso de Postgrado “Ciclo de proliferación celular”. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México, D.F. 1995.

— **Gonzalo Giménez-Martín y Consuelo de la Torre.**

Curso de Postgrado “Proliferación celular y su aplicación a la evaluación de genotoxicidad”. Universidad Austral de Chile, Valdivia. 1995.

Curso de Postgrado “Proliferación celular y Cáncer”. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México D.F., 1996.

— **Aldo González.**

Coordinador, Jornadas en el CSIC “El valor estratégico de la investigación científico y técnica. Unas jornadas de reflexión sobre la política científica en España”, Madrid, Septiembre, 1996.

— **Pablo Hernández.**

Coordinador del Curso de Doctorado del Dpto. de Biología Celular y del Desarrollo “Proliferación y diferenciación celulares: I. Funciones celulares básicas”. Universidad de Alcalá de Henares y Complutense de Madrid 1995-1996.

— **Santiago Lamas.**

Coorganizador. Workshop “*Molecular Biology and Pathophysiology of Nitric Oxide*”. Fundación Juan March. Madrid, Junio 1995.

Secretario científico del *XIIIth International Congress of Nephrology*. Madrid, Julio, 1995.

Organizador del I curso de Introducción a la Biología Molecular para Clínicos. Sitges, Enero, 1996.

— **Dionisio López Abella.**

Universidad Complutense de Madrid. Transmisión de virus de plantas por artrópodos vectores. Curso académico 1995-1996 y 1996-1997.

— **Rubens López García.**

Miembro del Comité Organizador de las Primeras Jornadas de Biociencia. Madrid, 1995.

Miembro del Comité Organizador del International Workshop on *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology and Mechanisms of Diseases—Updates for the 1990s. Oeiras, Portugal, 1996.

Premios y Distinciones/Awards and Honours

— **Angel T. Martínez y M^a Jesús Martínez.**

Curso de doctorado sobre Biodegradación de la lignocelulosa: Aplicaciones Tecnológicas. Facultad de Ciencias de la Universidad de Alcalá de Henares (colaboración con el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias) (1994-1995 y 1995-1996).

Red temática Biotecnología-CICYT sobre Biodegradación de Lignina y Hemicelulosa: Aspectos químicos, enzimáticos y moleculares, y sus aplicaciones industriales y medioambientales. (1993-1996).

— **Francisco Javier Medina Díaz.**

Miembro del Comité Científico. 6^o Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. Organizador de la Mesa Redonda "Biología Celular: ¿contexto o campo disciplinar?". Lleida, 1995

— **Sara I. Pérez Prieto.**

Co-organización con el equipo de J. Borrego, Universidad de Málaga, de la Primera Reunión Nacional del Grupo de Microbiología del Medio Acuático, Sociedad Española de Microbiología. Torremolinos, Abril, 1996.

— **Sara I. Pérez Prieto y Juan José Borrego.**

Mesa redonda Supervivencia y Diversidad de Microorganismos en el Medio Acuático. XV Congreso Nacional de Microbiología. Madrid, Septiembre, 1995.

— **María Carmen Risueño y Pilar Sánchez Testillano.**

Workshop sobre Criométodos. Congreso Nacional de Biología Celular. Lérida, Septiembre, 1995.

Curso en la Universidad de Lérida. "Avances recientes de criométodos en Biología". Lérida, Septiembre, 1995.

— **María Carmen Risueño, Inmaculada Herrera y Pilar Sánchez Testillano.**

Curso de Aplicación de la microscopía electrónica de transmisión y barrido en biología molecular: Criotécnicas, inmunomicroscopía electrónica e hibridación in situ. Centro de Biotecnología e Ingeniería Genética. La Habana (Cuba). Febrero, 1996.

— **Juan Manuel Ramírez de Verger.**

Coorganizador. Workshop on "Molecular Recognition in Photosynthesis", European Science Foundation, Programme "Biophysics of Photosynthesis". Jaca, Septiembre, 1996

— **Luis Rivas López.**

Director del curso de Doctorado del Programa de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias. "Parasitología Molecular". Madrid, Febrero-Abril, 1995-1996.

Coorganización con D. Andreu y F. Baquero de la Reunión de la Fundación Ramón Areces. "Antimicrobial peptides". Madrid, Mayo, 1996.

Coorganizador con M. Fresno y A. Sher del Workshop "Cytokines in Infectious Diseases", Fundación Juan March. Madrid, Junio, 1996.

— **Miguel Vicente Muñoz.**

Structure, Function and Controls in Microbial Division. Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. Madrid. (Co-organizador) Mayo, 1995.



Seminarios del Centro

Seminars

1995

Dra. M^a Eugenia Armengod.

Instituto de Investigaciones Citológicas. Valencia.

Regulación de genes de *E. coli* esenciales para la replicación y reparación del DNA.

Prof. Fernando de la Cruz.

Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria.

Diversidad e interacciones de los distintos sistemas de conjugación genética.

Dr. Enrique Flores García.

Universidad de Sevilla.

Control global de la asimilación de nitrógeno mediado por el regulador NtcA en las cianobacterias.

Dr. Thomas Michel.

Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase, a substrate for its functional translocation.

Dr. Merle S. Olson.

The importance on novel lipid and peptide mediators in the liver.

Dra. Cristina Pujades.

Características bioquímicas y funcionales de la integrina VLA-4. Identificación del sitio responsable de las interacciones laterales en la subunidad A42.

Dr. Masashi Suzuki.

General structural aspects of DNA and transcription factors in interaction.

Dr. Bruce Stillman

Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA

The mechanism and regulation of eukaryotic DNA replication.

Dra. Evelyn Waldstein

Tel Aviv University. Tel Aviv, ISRAEL

Modified base mismatches and mismatch repair.

Dr. Marcel Mechali

Institut Jacques Monod. Paris, FRANCIA

Determination of gene expression and control of initiation of DNA replication during early embryonic development.

1996

Dra. Cecilia M^a Arraiano.

Inst. Tecnologia Quimica e Biologica. Univ. Nova, Lisboa.

mRNA degradation: ribonucleases and different decay mechanisms.

Dr. Oriol Bachs.

Dpto. de Biología Celular. Universidad de Barcelona.

Papel de la calmodulina en el control de la proliferación celular.

Dr. Udo Bläsi.

Institut of Microbiology and Genetics. Viena, Austria.

Dual-start motif holins and anti-holins in the regulation of phage induced host cell lysis: Two strategies for a single purpose?

Prof. Antonio Celada.

Departamento de Fisiología. Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. Barcelona.
Aventuras en el clonaje de factores de transcripción del promotor del gen IA.

Dr. Frank Cutitta.

Deputy branch chief. Division of Cancer Prevention and Control National Cancer Institute. USA.
Adenomedulin, a new pluripotent peptide: Its detection and functions.

Dr. Alan Dobson.

University College Cork Irlanda.

The ligninolytic enzyme system of Trametes versicolor and its application in the biodegradation of xenobiotic compounds.

Prof. Douglas T. Fearon.

University of Cambridge. Cambridge, Inglaterra.

How the B lymphocyte determines the biological relevance of an antigen.

Dr. Rafael Garesse.

Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC.

Biogénesis mitocondrial en *Drosophila melanogaster*.

Dra. María Gasset.

Instituto de Química Física "Rocasolano", CSIC. Madrid.

Caracterización conformacional de las proteínas del prión.

Dr. Stephen Harding.

National Centre for Macromolecular Hydrodynamics. Universidad de Nottingham, Reino Unido.

The Ultracentrifuge spins again for protein-protein interactions.

Prof. John M. Harlan.

Division of Hematology. University of Washington. School of Medicine. USA.

Mechanisms and consequences of leukocyte adhesion to endothelium.

Dr. Jules A. Hoffman.

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire. CNRS. Strasbourg, Francia.

The induced antimicrobial peptides of Drosophila: structures and gene expression.

Dr. Francisco Iborra.

Sir William Dunn School of Pathology. University of Oxford, UK.

Factores de transcripción en células de mamífero.

Prof. David Knaff.

Universidad de Texas, Lubbock, USA.

Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes

Dr. Antonio Lanzavecchia.

Basel Institute of Immunology. Basilea, Suiza.

How does the T-cell receptor work?

Dr. Pedro A. Lazo.

Centro Nacional de Biología Fundamental. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

Proteínas tetraspan o TM4SF: el antígeno CD53 como prototipo en células linfoides.

Dr. Abelardo López Rivas.

Instituto de Parasitología y Biomedicina. CSIC. Granada.

Regulación de la apoptosis en linfocitos T: Papel del sistema Fas/FasL.

Dr. Víctor de Lorenzo.

CIB (CSIC).

De cómo *Pseudomonas* responde las preguntas de químicos y biólogos.

Prof. Dr. W.J. Lucas.

Universidad de California. Davis. USA.

Role of Plasmodesmata in cell-to cell transport in plants: parallels between viral & endogenous macromolecular trafficking.

Dr. David Mckney.

Department of Microbiology. GBF. Alemania.

Bioremediation of polychlorinated biphenyls: Heterologous expression of biphenyl dioxigenase-encoding genes from a Gram-positive broad spectrum PCB degrader.

Dr. Bidyut K. Mohanty.

Duke University Medical Center. Durham, North Carolina, USA.

Replication termination proteins and transcription.

Dr. Manuel Nieto.

Instituto de Neurobiología "Santiago Ramón y Cajal", CSIC. Madrid.

Inhibición del crecimiento de un modelo de glioma cerebral.

Dr. Leandro Peña.

IVIA, Valencia.

Mejora genética de cítricos mediante biotecnología.

Dr. José M^a de Pereda.

Biochemistry and Molecular Biology, Biocenter. Universidad de Viena, Austria.

Secuencias de la superficie de tubulina y microtúbulos. Homología de estructura secundaria con la proteína de división celular bacteriana FtsZ.

Dr. Gaspar Pérez Martínez.

Inst. Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Valencia

Estudio de la represión catabólica en *Lactobacillus casei*.

Dr. Vincenzo Pirrotta.

Dept. of Zoology, Sciences 3. University of Geneva. Suiza.

Chromatin-based cellular memory regulating homeotic gene expression.

Dr. Hernando A. del Portillo.

Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Plasmodium vivax: Estudios moleculares y desarrollo de vacunas.

Dr. A.P. Pugsley.

Unité de Génétique Moléculaire. Institut Pasteur. Paris - Francia.

Protein secretion in Escherichia coli: Beyond Sec.

Dra. Daniela Rhodes.

MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK.

Towards and understanding of protein-DNA recognition.

Dr. Nazario Rubio.

Instituto de Neurobiología "Santiago Ramón y Cajal", CSIC. Madrid.
Transferencia génica con vectores adenovirus.

Dr. Vicente Rubio.

Instituto de Investigaciones Citológicas. Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas, Valencia.
La familia de las carbamil fosfato sintetasas y carbamato quinasa: Estudios de estructura-función.

Dr. José Ruiz Herrera.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Irapuato, México.
El dimorfismo de *Ustilago maydis* como modelo de diferenciación celular.

Prof. Robert T. Sauer.

Massachussetts Institute of Technology. Cambridge, USA.
Sequence determinants of protein folding and degradation.

Dr. Juan Saus.

Instituto de Investigaciones Citológicas. Fundación Valencia de Investigaciones Biomédicas, Valencia.
La fosforilación de serinas es un evento en la biología de autoantígenos humanos.

Dr. Claudio Scazzocchio.

Institut de Génétique et Microbiologie. Université de Paris-Sud. Paris Francia.
Agrupamientos génicos en Ascomicetos: Inducción específica, represión catabólica y acción a distancia.

Dr. Peter Shaw.

John Innes Centre. Norwich, Reino Unido.
The nucleolus, a nuclear domain of transcription and transcript processing.

Dr. Ernest HK Stelzer.

EMBL, Heidelberg, Alemania.
Will a confocal microscope improve your image? Current limits and the perspectives of confocal fluorescence microscopy.

Dr. José Manuel Sogo.

Institut für Zellbiologie. ETH - Hönggerberg, Zurich, Suiza.
Replicación y transcripción en rDNA locus de levadura.

Dr. Detlev Suckau.

Bruker-Franzen Analytik GmbH. Alemania
Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry: Introduction to a new technique for biopolymer analysis.

Dra. Ariane Toussaint.

Université J. Fourier. Grenoble, Francia
Starvation and regulation of bacteriophage Mu transposition.

Dr. Juan Valcarcel.

EMBL, Heidelberg, Alemania.
Mecanismos de reconocimiento y regulación de sitios 3' de splicing.

Dra. Fiona Watt.

Imperial Cancer Reserach Fund. Keratinocyte Laboratory. London, UK.
Role of cell adhesion molecules in regulating keratinocyte growth and differentiation.

Dr. Ellen Zechner.

Karl-Franzens Universität Graz, Austria.
Factors affecting the intracellular nickin reaction at the conjugative origin of plasmid R1.

Personal de Servicios

Dirección

Director: GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO
Vicedirector: RUBENS LÓPEZ GARCÍA
Vicedirectora: CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA
Secretaría: ANA CHAO VÁZQUEZ
FRANCISCO JOSÉ QUEIJA PÉREZ

Gerencia

Gerente: GERMÁN LERMA RODRIGO
LUIS GARCÍA TRUJILLO

Administración

Administrador: ÁNGEL ABRIL NOVELLA

JULIA ANADES BESNARD
CONCEPCIÓN CHORRO DE VILLACEBALLOS
ESTRELLA GONZÁLEZ HERRADURA
NIEVES GONZÁLEZ ESTEBAN
MARÍA SOLEDAD REIG FERNÁNDEZ

Compras y Almacén

Jefe de Compras y Almacén: RAMÓN SERRANO CORONADO
ELISA BALLESTEROS VILLAMAYOR
MARGARITA FERNÁNDEZ GARCÍA
MANUEL PÉREZ CABRIA
M^ª TERESA RAMOS JIMÉNEZ
EZEQUIEL TORIBIO TORIBIO

Servicios Generales

Conserjería

JAVIER DE LA FLOR HERNÁNDEZ
DIEGO GARCÍA HERRANZ
LUCÍA GONZÁLEZ DÍAZ
J. MANUEL MARTÍN SIERRA

Limpieza de Material y Lavandería

BLASA CARRIÓN FERNÁNDEZ
PURIFICACIÓN FERNÁNDEZ ORTIZ
SARA FUENTES ROMERO
FELICIDAD LARA MARTÍNEZ
CARMEN LÓPEZ CASTELLANOS
MARÍA LÓPEZ RAMÍREZ
ISABEL LÓPEZ ROMERA
LUISA MESEGUER FABREGAT
FRANCISCA MORANTE GONZÁLEZ
BÁRBARA MORENO JIMÉNEZ
SOLEDAD PASTOR ENCABO
FRANCISCA VALLE RUBIO

Comedor

BEATRIZ FRAILE FERNÁNDEZ
ANGELA MUÑOZ ALONSO
DOLORES PORTERO LAULA
ENCARNACIÓN SÁNCHEZ RUIZ
FELINA SOMOLINOS GARCÍA

Franqueo

JOSÉ M. GORDILLO RODRÍGUEZ

Vigilancia

LORENZO MONTERO VERA
DOMINGO MURIEL MUNOZ
JULIAN ROMERO ORIHUEL
ANTONIO MORENO CALLE

Servicio Técnico

Jefe de S. Técnico: ANTONIO GARCÍA ÁLVAREZ
LORENZO ALONSO MACARRÓN
ANGEL ARRANZ BOMBÍN
JOSÉ CABANAS OLIVARES
GABRIEL GARCÍA GARCÍA
ANGEL GUERRERO RIVERO
M^a JOSÉ HERNÁNDEZ PARADELO
ANGEL PACHECO DEL OLMO
ANTONIO PÉREZ PARDO
ANTONIO RODRÍGUEZ MEDRANO
JOSÉ SANTIAGO ROJO
JUAN MIGUEL TIJERO PÁRAMO
FRANCISCO TIRADO AMARILLA
JESÚS TOLEDANO SOLORZANO
MANUEL RAMÓN TORO MONSALVE
ANTONIO VALLEJO DOMÍNGUEZ
ALFREDO VALLEJO DOMÍNGUEZ
PALOMA VELASCO DE LA ROCA

Delineación

AURELIO HURTADO CARO

Fotografía

MÓNICA FONTENLA LAGO
VICTORIA MUÑOZ MARTÍN

Informática

JOSÉ MANUEL ANGULO ZAPATERO

Servicios Especiales

Microscopía Electrónica

Responsable Científico:
DR. FRANCISCO JAVIER MEDINA

M^a DOLORES GUIRAO REY
JOSÉ RAMÓN DÍAZ BUENO

Animalario

Responsable Científico:
DR. J. MARÍA ROJO HERNÁNDEZ

DIEGO DÍAZ IZQUIERDO
GABINO GARCÍA AMAYA
FRANCISCO JOSÉ GARCÍA GONZÁLEZ
MANUEL MORENO CALLE

Cromatografía

Responsable Científico:
DR. JUAN ANTONIO LEAL OJEDA

ALICIA PRIETO ORZANCO

Cultivo de Células Animales

Responsable Científico:
DRA. PILAR VILAS MINONDO

BLANCA PÉREZ MACEDA
ALEJANDRA MARTÍN RUIZ

Química de Proteínas

Responsable Científico:
PROF. GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO

JAVIER VARELA ESPINOSA
EMILIA APORTA SOSA

Citometria de Flujo

Responsable Científico:
DR. CARMELO BERNABEU QUIRANTE

PEDRO LASTRES VARO

Microscopía Confocal

Responsable Científico:
DR. ENRIQUE DE LA ROSA CANO

M^a ANGELES OLLACARIZQUETA DONAZAR

Ultracentrifugación Analítica

Responsable Científico:
DR. GERMÁN RIVAS CABALLERO

Secuenciación Automática de DNA

Responsable Científico:
DR. SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA

ASUNCIÓN DÍAZ CARRASCOSA

Bioinformática

Responsable Científico:
DR. JAVIER REY CAMPOS

MARIO GARCÍA LACOMA

Espectroscopía

Responsable Científico:
PROF. JUAN MANUEL RAMÍREZ DE VERGER

Biblioteca

EVENCIO CABRERIZO DE LAS HERAS
M^a ANTONJA HERMIDA GONZÁLEZ
M^a TERESA MARTÍNEZ PARDO
ANGELES SACRISTÁN MARTÍN
J. MIGUEL SOTO ESTÉBANEZ
M^a JESÚS VILELA MANRIQUE

Reprografía

M^a JESUS GARABITO SECO

Radiactividad

Responsable Científico:
DR. EDUARDO RIAL ZUECO

MARTA CEBRIAN ECHARRI

Esterilización

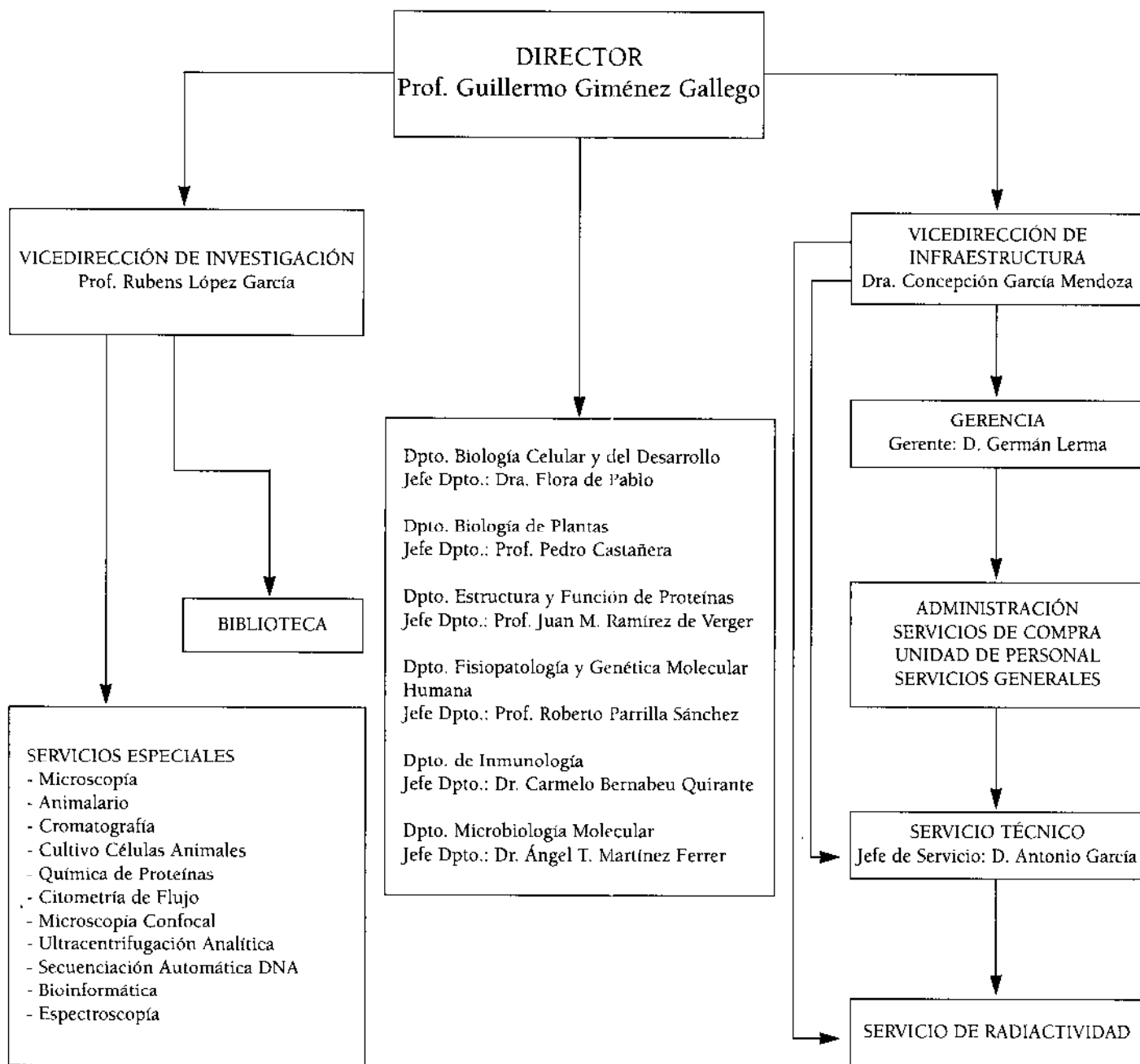
Responsable Científico:
DRA. PILAR VILAS MINONDO

ROSA DÍAZ LÓPEZ

Secretarias

M^a VICTORIA LAFITA TOGORES
M^a CARMEN PARTEARROYO LACABA
OLVIDO PARTEARROYO LACABA

ORGANIGRAMA CIB



Jubilaciones, Altas y Bajas de Personal

Jubilaciones

Investigadores Científicos

González Fernández, Aurora
Pérez Ureña, María Teresa
Reyes Ramírez, Fuensanta
Torrontegui Pico de Coaña, Gertrudis

Ayudantes Diplomados, Ayudantes y Auxiliares de Investigación

Días-Amado Cabanillas, Carmen
López Hermida, Concepción
Conde Viced, Antonia
González Hernández, Delfín
Morales Alvarez, José
Fernández Fernández, José

Personal Laboral y Subalterno

Blanco Marcos, José
Bodega Muñoz, Gregorio
De la Flor Fernández, Florentino
Gutiérrez Sanz, Ángel
Jiménez Contreras, María

Altas 1995 - 1996

Colaboradores Científicos

Rivas Caballero, Germán
Rodríguez Martínez, Ramón

Ayudantes y Auxiliares de Investigación

Aporta Sosa, Emilia
Quesada Guerrero, Virginia
Reig Fernández, María Soledad
Ruiz Pazos, Luis
Hernández Paradelo, María José

Personal Laboral

Carrasco Soto, María Jesús

Traslados

Investigadores Científicos

De Lorenzo Prieto, Víctor

Ayudantes Diplomados y Auxiliares de Investigación

Cabrero Alonso-Majagranzas, Esperanza
Jiménez Sanz, Yolanda

Personal Laboral y Subalterno

López Adsuara, Celia

RESUMEN DE DATOS ECONÓMICOS

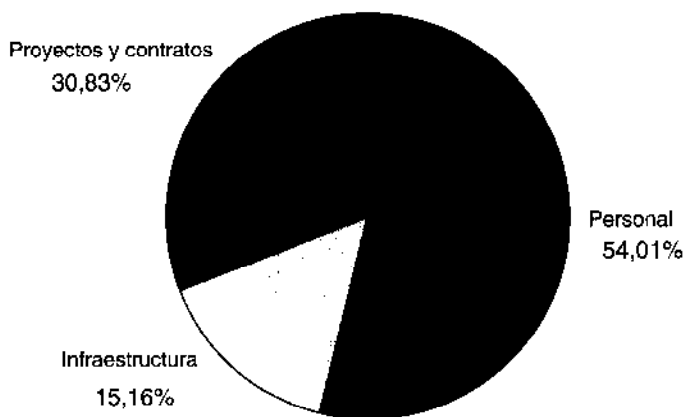
PRESUPUESTO DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Concepto	1995	1996
Presupuesto ordinario	98.011	98.109
Inversiones	96.081	84.921
Apoyo a la infraestructura	89.119	82.257
Explotación del comercio	17.128	16.701
Total de infraestructura del centro	300.339	281.988
Proyectos CICYT, DGICYT y CAM	310.438	273.019
Proyectos FIS y contratos con empresas	143.583	90.869
Programas de la Unión Europea	156.939	133.277
Total de proyectos y contratos	610.960	497.165
Personal	1.070.242	1.080.745
Total	1.981.541	1.859.898

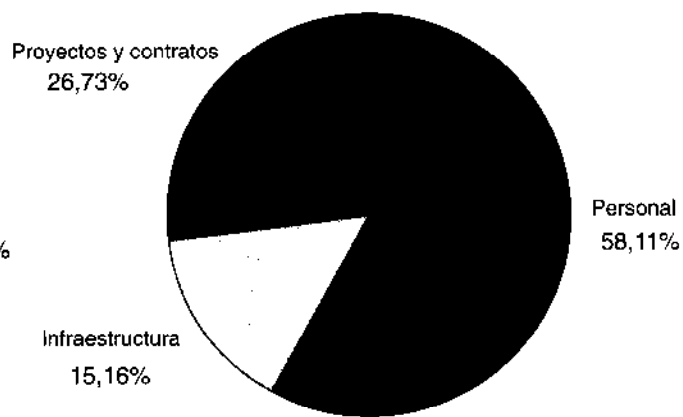
En miles de pesetas

■ Proyectos y contratos ▨ Infraestructura ■ Personal

1995



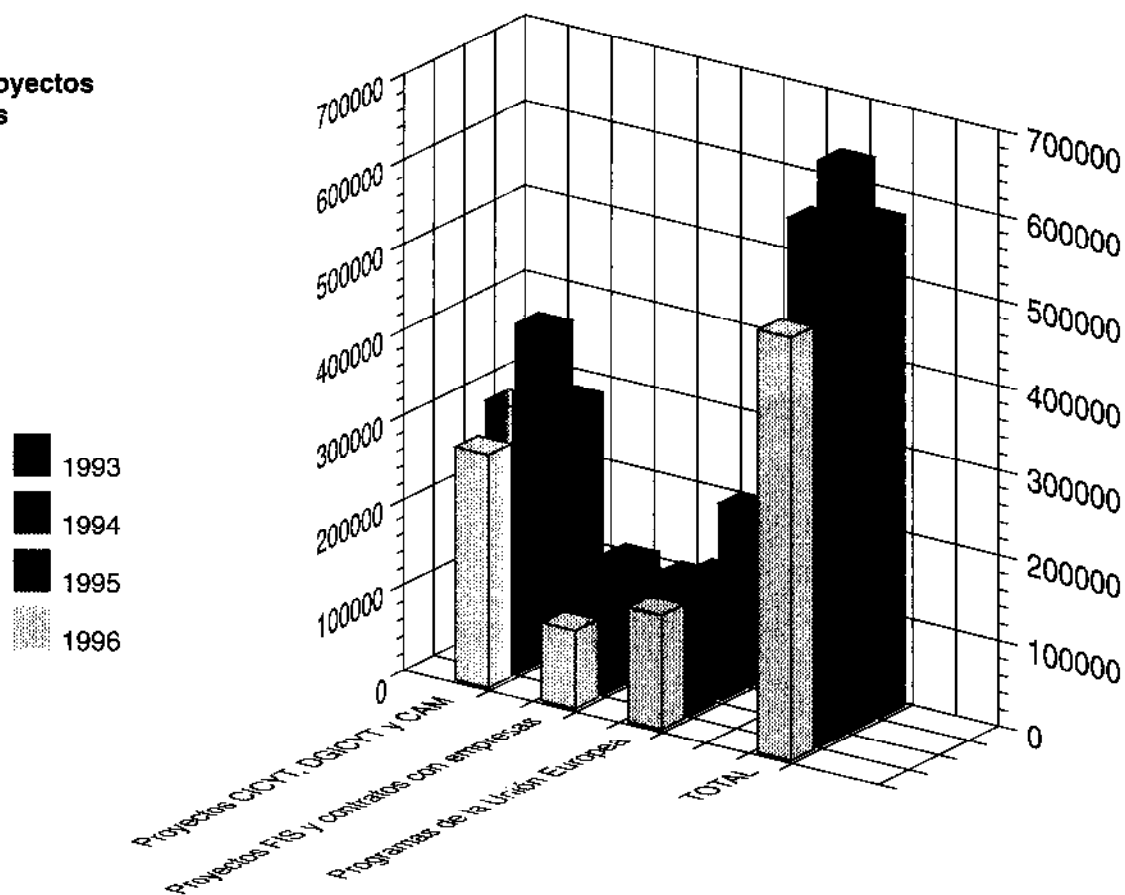
1996



FINANCIACIÓN OBTENIDA POR LOS PROYECTOS DEL CIB

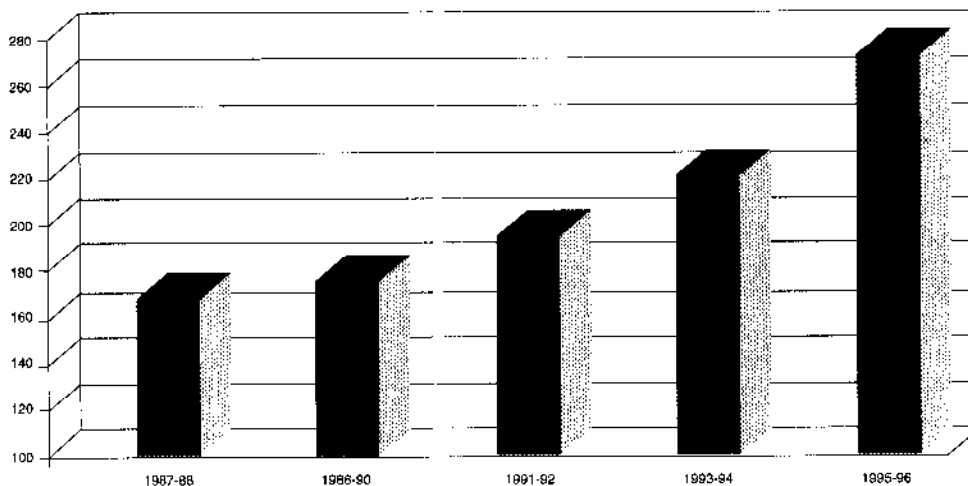
Concepto	1993	1994	1995	1996
Proyectos CICYT, DGICYT, Y CAM	281.722	383.678	310.438	273.019
Proyectos FIS y contratos con empresas	90.795	135.768	143.583	90.869
Programas de la Unión Europea	203.849	142.408	156.939	133.277
Total	576.367	661.855	610.960	497.165

En miles de pesetas

Financiación de Proyectos
en Miles de Pesetas

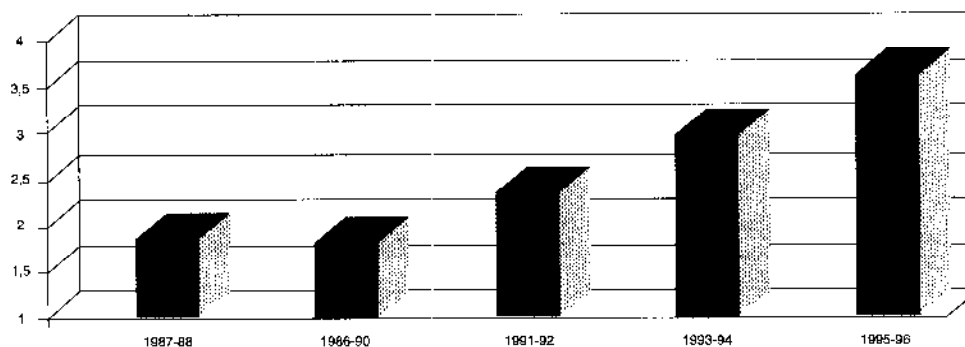
EVOLUCIÓN DEL NÚMERO DE PUBLICACIONES Y SU IMPACTO

Evolución del número de artículos en el SCI*
por bienio



Bienio de la Memoria del CIB

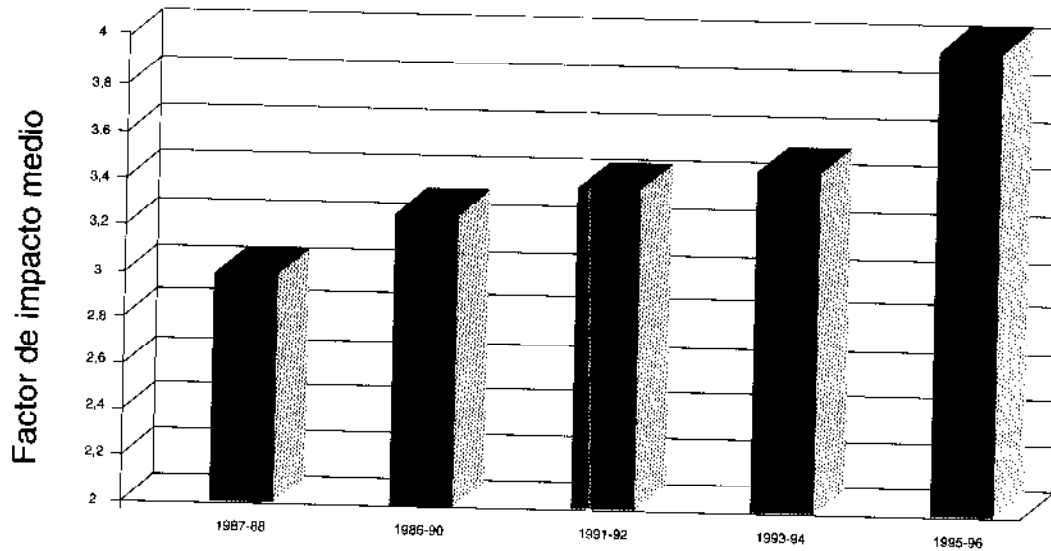
Evolución del número de artículos en el SCI*
por investigador



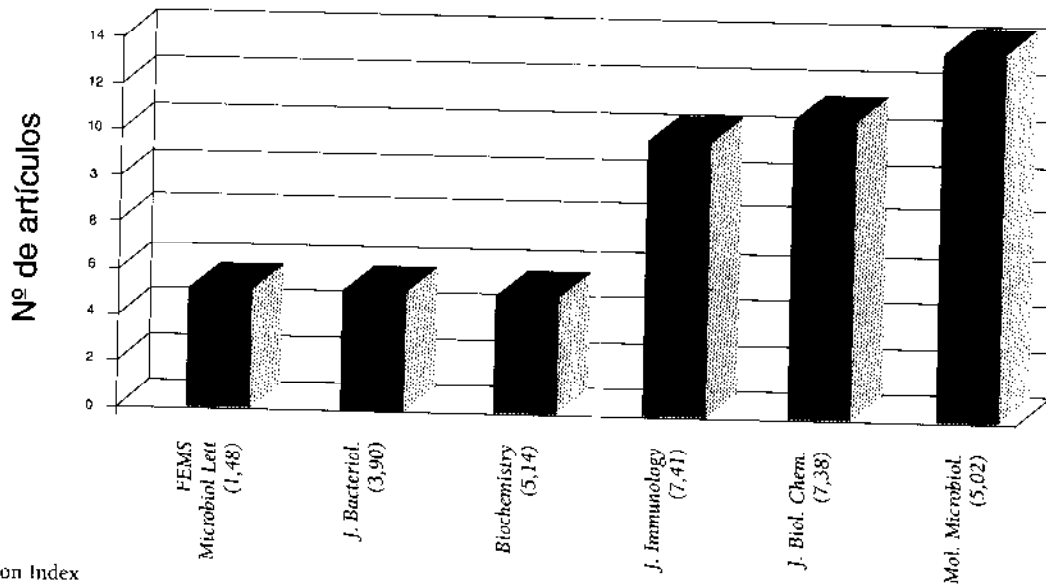
Bienio de la Memoria del CIB

* Science Citation Index

Evolución del Factor de Impacto medio de las revistas utilizadas*



Revistas en las que los investigadores del CIB publicaron más frecuentemente en 1995-1996 (y su factor de impacto en 1995)*



* Scienc Citation Index

Indice de Investigadores en Plantilla

<u>Nombre</u>	<u>Escala</u>	<u>E-mail</u>	<u>Teléfono</u>	<u>Pág.</u>
-Abrisqueta Zarrabe, J. Antonio	Investigador C.		5620307	96
-Aller Tresguerres, Patricio	Colaborador C.	cibat3a@pinar1.csic.es	4247	12
-Andreu Morales, J. Manuel	Profesor I.	cibjm07@cc..csic.es	4381	78
-Aparicio Alonso, Pedro J.	Profesor I.	pjaparicio@fresno.csic.es	4363	87
-Barasoain Blasco, Isabel	Colaborador C.	cibib51@cc..csic.es	4216	123
-Bernabeu Quirante, Carmelo	Investigador C.	cibbq5@cpinar1.csic.es	4246	116
-Botella Cubells, M ^a Luisa	Colaborador C.	cibmb2q@pinar1.csic.es	4312	23
-Casado Moragón, Angela	Colaborador C.		4219	98
-Castañera Domínguez, Pedro	Profesor I.	cibc120@fresno.csic.es	4264	48
-De La Hera Martínez, Antonio	Colaborador C.	adelaheira@fresno.csic.es	4394	126
-De La Rosa Cano, Enrique	Colaborador C.	cibjr1b@pinar1.csic.es	4274	37
-De La Torre García-Quintana, Consuelo	Profesor I.	cibtg1n@cc..csic.es	4307	9
-De Pablo Dávila, Flora	Investigadora C.	cibfp1f@fresno.csic.es	4360	37
-Del Mazo Martínez, Jesus	Colaborador C.	cibjm26@cc..csic.es	4324	30
-Díaz Orejas, Ramón	Investigador C.	cibrd17@cc..csic.es	4351	162
-Díaz Ruiz, J. Ramón	Profesor I.	cibdr89@fresno.csic.es	4406	57
-Díez Cores, José Luis	Investigador C.		4311	23
-Espinosa Padrón, Manuel	Profesor I.	cibmel13@cc..csic.es	4209	84
-Esponda Fernández, Pedro	Investigador C.	cibef6k@pinar1.csic.es	4336	34
-Fernández Gómez, M ^a Encarnación	Investigadora C.		4257	42
-Fernández Tresguerres, M ^a Elena	Colaboradora C.		4353	162
-García González, Pedro	Colaborador C.	cibpa61@pinar1.csic.es	4428	149
-García Hermida, Ofelia	Colaboradora C.	cibgh8d@fresno.csic.es	4355	101
-García López, Ernesto	Profesor I.	mio@pinar1.csic.es	4428	149
-García López, J. Luis	Investigador C.	cibjl16@pinar1.csic.es	4418	149
-García Luque, Isabel,	Colaboradora C.		4410	57
-García Mendoza, Concepción	Investigadora C.		4262	141
-García Pardo, Angeles	Investigadora C.	cibgp96@cc.csic.es	4430	110
-Giménez Gallego, Guillermo	Profesor I.	gimenez_gallego@fresno.csic.es	4378	67
-Goday Baylina, Clara	Colaboradora C.	claragoday@cc.csic.es	4314	21
-Gómez Alarcón, Gonzalo	Colaborador C.		4269	104
-González Becerra, Aldo	Colaborador C.	cibgl17@fresno.csic.es	4414	166
-Gutiérrez Rueda, Carmen	Colaboradora C.		4386	144
-Hernández Valenzuela, Pablo	Colaborador C.	cibph67@fresno.csic.es	4232	5
-Jareño Cañada, M ^a Asuncion	Colaboradora C.		4395	101
-Krimmer Smunis, Dora Beatriz	Colaboradora C.	cibbk68@fresno.csic.es	4238	5
-Lamas Peláez, Santiago	Colaborador C.	slamas@fresno.csic.es	4302	67
-Larraga Rodríguez de Vera, Vicente	Profesor I.	ciblr1a@cc.csic.es	4207	82

Índice de Investigadores Actuales en Plantilla

<u>Nombre</u>	<u>Escala</u>	<u>E-mail</u>	<u>Teléfono</u>	<u>Pág.</u>
-Leal Ojeda, J. Antonio	Investigador C.		4437	147
-López Abella, Dionisio	Profesor I.	ciblm34@pinar1.csic.es	4404	57
-López García, Paloma	Investigadora C.	plopez@cc.csic.es	4203	72
-López García, Rubens	Profesor I.		4428	149
-Marquet Espinosa, Alberto	Colaborador C.		4245	82
-Martín González Antonio	Investigador C.		4436	94
-Martín Requero, M ^a Angeles	Colaboradora C.	cibah18@pinar1.csic.es	4224	101
-Martínez Ferrer, Angel T.	Investigador C.	cibm149@fresno.csic.es	4407	136
-Martínez Hernández, M ^a Jesus	Colaboradora C.	cibjm5i@pinar2.csic.es	4439	136
-Medina Díaz, F Javier	Colaborador C.	cibjm65@fresno.csic.es	4261	42
-Moreno Díaz De La Espina, Susana	Colaboradora C.	cibme7c@fresno.csic.es	4257	42
-Ortego Alonso, Felix	Colaborador C.	cibc120@fresno.csic.es	4266	48
-Parrilla Sánchez, Roberto	Profesor I.	cibrp54@cc.csic.es	4204	101
-Paez Abril, Eduardo	Colaborador C.	cibep44@cc.csic.es	4387	132
-Pérez Prieto, Sara Isabel	TSE		4385	144
-Peñalva Soto, Miguel A.	Investigador C.	cibma15@cc.csic.es	4358	155
-Ramírez De Verger, Juan M.	Profesor I.	jramirez@fresno.csic.es	4369	67
-Rey Campos, Javier	Colaborador C.	jrey@fresno.csic.es	4416	18
-Rial Zueco, Eduardo	Colaborador C.	rial@fresno.csic.es	4236	64
-Risueño Almeida, M ^a Carmen	Investigadora C.	cibr125@fresno.csic.es	4230	51
-Rivas Caballero, Germán	Colaborador C.	grivas@fresno.csic.es	4234	90
-Rivas López, Luis	Colaborador C.	cibli29@cc.csic.es	4304	75
-Robles Chillida, Elias M.	Colaborador C.		4275	55
-Rodríguez De Cordoba, Santiago	Investigador C.	srdec@pinar1.csic.es	4432	129
-Rodríguez Murcia, Carlos.	Investigador C.		5627622	96
-Rodríguez Saint-Jean, Sylvia	TSE	cibrs2l@cc.csic.es	4384	144
-Rodríguez Martínez, Ramón B.	Colaborador C.	cibrm6z@pinar2.csic.es	4225	101
-Rojo Hernández, José M ^a	Investigador C.		4217	108
-Romero Garrido, Antonio	Colaborador C.	romero@pinar1.csic.es	4244	---
-Sanchez Ayuso, Matilde	Investigadora C.	cibms02@cc.csic.es	4225	101
-Sánchez Rodríguez, Lucas	Investigador C.	cibsr6b@pinar2.csic.es	4322	26
-Schvartzman Blinder, Jorge Bernardo	Colaborador C.	cibjb21@fresno.csic.es	4233	5
-Serra Yoldi, M ^a Teresa	Colaboradora C.	cibsy7f@fresno.csic.es	4411	57
-Silva González, Augusto	Colaborador C.	cibsg9d@fresno.csic.es	4431	120
-Suárez González, M ^a Teresa	Colaboradora C.		4357	155
-Teixidó Calvo, Joaquín	Colaborador C.	cibjt9b@fresno.csic.es	4392	112
-Torroja Cavanillas, Eduardo	Investigador C.		4323	29
-Vicente Muñoz, Miguel	Investigador C.	cibmv5j@fresno.csic.es	4375	2
-Vidal Caballero, Miguel A.	Colaborador C.	cibvc1yf@fresno.csic.es	4382	15
-Vilas Minondo, Pilar	Investigadora C.		4391	144

(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)