



CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
SEVERO OCHOA

MEMORIA CIENTÍFICA

Scientific Report 2011-2012

CBMSO

MEMORIA CIENTÍFICA

Scientific Report 2011-2012



CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA

C/ Nicolás Cabrera, 1
Campus de la Universidad Autónoma de Madrid
28049 Madrid

Tel.: (+34) 91 196 4401

Fax: (+34) 91 196 4420

www.cbm.uam.es

4 Reflexiones del Director / Director's Remarks

6-13 El CBMSO en breve / The CBMSO in a nutshell

BIOLOGÍA CELULAR

E INMUNOLOGÍA / Cell Biology and Immunology

- 16 Transmisión de señales a través del receptor para el antígeno de células T
Signal transduction through the T cell antigen receptor
Balbino Alarcón Sánchez
- 18 Polaridad Celular
Cell Polarity
Miguel A. Alonso Lebrero
- 20 Glicogenómica Funcional
Functional Glycogenomics
Pedro Bonay Mirons
- 22 Interacciones funcionales entre la tetraspanina CD9 y moléculas de adhesión celular
Functional interactions between tetraspanin CD9 and cell adhesion molecules
Carlos Cabañas Gutiérrez
- 24 Interacción entre el citoesqueleto y la membrana plasmática
Cytoskeleton-plasma membrane interactions
Isabel Correias Hornero
- 26 Inmunología Viral
Viral Immunology
Margarita del Val Latorre
- 28 Susceptibilidad Genética en Enfermedades complejas: genes implicados en el desarrollo de linfomas linfoblásticos T
Genetic susceptibility in complex diseases: genes involved in T-cell lymphoma development
José Fernández-Piqueras
- 30 Mediadores proinflamatorios y su implicación en enfermedades de etiología inflamatoria e inmune
Proinflammatory mediators and their involvement in immune and inflammatory-mediated diseases
Manuel Fresno Escudero
- 32 Acciones de los prostanoïdes en procesos inflamatorios
Prostanoids actions in Inflammatory Processes
Miguel Ángel Iñiguez Peña
- 34 Células troncales tumorales
Cancer Stem Cells
Marta Izquierdo Rojo
- 36 Fisiopatología Molecular del Endotelio Vascular
Molecular pathophysiology of the vascular endothelium
Santiago Lamas Peláez
- 38 Papel de la transición epitelio-mesénquima de las células mesoteliales en fibrosis y cáncer
Role of the epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells in fibrosis and cancer
Manuel López Cabrera
- 40 Mecanismo de asociación de HLA-B27 con espondiloartropatías (JALC)
Mechanism of association of HLA-B27 with spondyloarthropathies (JALC)
José A. López de Castro
- 42 Laboratorio de polaridad epitelial
Epithelial polarity laboratory
Fernando Martín Belmonte
- 44 Receptores acoplados a proteínas G: redes de señalización e implicaciones fisiopatológicas
G protein-coupled receptor networks: signal transduction and pathophysiological implications
Federico Mayor
- 46 Mecanismos moleculares de interacción virus-célula: el modelo del virus de la peste porcina africana
Virus Cell Interaction. The ASFV Model
Yolanda Revilla Novella
- 48 Homeostasis metabólica
Metabolic homeostasis
Ignacio V. Sandoval
- 50 Óxido nítrico y respuesta inmune adaptativa: regulación y función de la actividad óxido nítrico sintasa en la activación y diferenciación de los linfocitos T
Nitric oxide and adaptive immune response: regulation and function of nitric oxide synthase activity in the activation and differentiation of T lymphocytes
Juan Manuel Serrador Peiró
- 52 Desarrollo del sistema linfohematopoyético humano
Development of the human lymphohematopoietic system
María Luisa Toribio García

VIROLOGÍA

Y MICROBIOLOGÍA / Virology and Microbiology

- 56 Modulación de la respuesta inmune por virus
Viral modulation of the immune response
Antonio Alcamí Pertejo
- 58 Bases moleculares de la patogenia y del potencial anti-cáncer de los Parvovirus
Molecular bases of Parvovirus pathogenesis and anti-cancer potential
José M. Almendral del Río
- 60 Ecología Molecular de Ambientes Extremos
Molecular Ecology of Extreme Environments
Ricardo Amils Pibernat
- 62 División Celular Bacteriana y Resistencia a Antibióticos
Bacterial Cell Division and Antibiotics Resistance
Juan Alfonso Ayala Serrano
- 64 Biotecnología y genética de bacterias termófilas extremas
Biotechnology and genetics of extreme thermophilic bacteria
José Berenguer Carlos
- 66 Virus de la peste porcina africana: modelos virales de evasión y protección
African swine fever virus: models of evasion and protection
Angel L. López Carrascosa
- 68 Morfogénesis Bacteriana
Bacterial morphogenesis
Miguel A. de Pedro Montalbán
- 70 Variabilidad genética de virus RNA
Genetic variability of RNA viruses
Esteban Domingo Solans
- 72 Bioingeniería de enzimas de levaduras para generar compuestos bioactivos
Yeast enzymes bioengineering to generate bioactive compounds
María Fernández Lobato
- 74 Ingeniería de Virus y Nanobiotecnología
Virus Engineering and Nanobiotechnology
Mauricio García Mateu
- 76 Efectos de elementos extracromosómicos sobre el comportamiento de su huésped *Bacillus* y mecanismos de transferencia génica horizontal en *Bacillus*
Effects of extrachromosomal elements on behaviour of its host and mechanisms of horizontal gene transfer in Bacillus
Wilfried J.J. Meijer
- 78 Retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana y terapia atirretroviral
Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and antiretroviral therapy
Luis Menéndez Arias
- 80 Virus de la peste porcina africana
African swine fever virus
María Luisa Salas Falgueras
- 82 Desarrollo de nuevas estrategias para el control y prevención de enfermedades virales: el virus de la fiebre aftosa como modelo
New strategies for prevention and control of viral diseases: foot-and-mouth disease virus as a model
Francisco Sobrino
- 84 Estructura del mRNA y control traduccional en sistemas biológicos
mRNA structure and translational control in Biological Systems
Iván Ventoso

DESARROLLO Y

DIFERENCIACIÓN / Development and Differentiation

- 88 Factores de transcripción y la formación de heterocromatina en *Drosophila melanogaster*
Transcription factors and heterochromatin formation in Drosophila
Natalia Azpiazu Torres
- 90 Control de la proliferación celular y regeneración mediado por señales intercelulares
Control of cell proliferation and organ regeneration through intercellular signals
Antonio Baonza Cuenca
- 92 Morfogénesis y Diferenciación del Sistema Nervioso de Vertebrados
Morphogenesis and Differentiation of the vertebrate CNS
Paola Bovolenta Nicolao
- 94 Regulación epigenética de la expresión génica durante el desarrollo de *Drosophila*
Epigenetic regulation of gene expression during Drosophila development
Ana María de Busturia Jimeno
- 96 Base molecular y celular de la organogénesis en *Drosophila*
Molecular and cellular basis of Drosophila organogenesis
Sonsoles Campuzano Corrales
- 98 Plasticidad Celular en Desarrollo y Cáncer
Cellular Plasticity in Development and Cancer
César Coboleda Hernández
- 100 Análisis de la señalización celular durante el desarrollo de epitelios en *Drosophila melanogaster*
Signalling pathways directing wing development and vein pattern formation in Drosophila
José F. de Celis Ibeas

- 102 Mecanismos de señalización en el desarrollo
Signaling mechanisms in development
Isabel Guerrero Vega
- 104 Especificación de destinos neuronales en el desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila*
Specification of Neuronal Identities in the Development of the Drosophila Central Nervous System
Fernando Jiménez Díaz-Benjumea
- 106 Control genético de la morfogenesis
Genetic control of morphogenesis
Ginés Morata Pérez
- 108 Función y mecanismo de acción de las caderinas atípicas durante el desarrollo de *Drosophila*
Functional analysis and molecular mechanism of atypical cadherins during Drosophila development
Isabel Rodríguez Enríquez
- 110 Genética del desarrollo de derivados mesodérmicos en *Drosophila*: sistemas muscular y de filtración
Developmental biology of mesoderm derivatives: muscular and systems
Mar Ruiz Gómez
- 112 Especificación segmental y formación de patrón en *Drosophila*
Segmental specification and pattern formation in Drosophila
Ernesto Sánchez-Herrero Arbide
- 148 Biogénesis y función de la mitocondria y su repercusión en patología
Biogenesis and function of mitochondria and its role in pathology
José Manuel Cuezva Marcos
- 150 Síntesis de proteínas y su regulación en eucariontes
Protein synthesis and its regulation in eukaryotes
César de Haro Castilla
- 152 Regulación post-transcripcional de la expresión génica en levaduras
Post-transcriptional Regulation of genetic expression in yeasts
Juan Pedro García Ballesta / Miguel Remacha Moreno
- 154 Organización funcional del genoma de mamíferos
Functional organization of the mammalian genome
Maria Gómez Vicentefranqueira
- 156 Replicación del DNA, división celular y cromatina
DNA replication, cell division and chromatin
Crisanto Gutiérrez Armenta
- 158 Redes reguladoras de la expresión génica
Gene expression regulatory networks
José María Izquierdo Juárez
- 160 Iniciación interna de la traducción en mRNAs eucarióticos
Internal initiation of translation in eukaryotic mRNAs
Encarnación Martínez-Salas
- 162 Regulación de la expresión génica en *Leishmania*
Regulation of gene expression in Leishmania
José María Requena Rolanía
- 164 Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias e investigación en nuevas terapias
Molecular basis of inherited metabolic diseases and research in novel therapies
Magdalena Ugarte / Lourdes Ruiz Desviat
- 166 Replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$
Replication of bacteriophage $\phi 29$ DNA
Margarita Salas Falgueras
- 168 Replicación cromosómica y estabilidad del genoma
Chromosome replication and genome stability
José Antonio Tercero Orduña

NEUROBIOLOGÍA MOLECULAR / Molecular Neurobiology

- 116 Fisiopatología de los transportadores de glicina en la neurotransmisión glicinérgica: hiperplexia y dolor
Physiopathology of glycine transporters in glycinergic neurotransmission: hyperplexia and pain
Carmen Aragón Rueda
- 118 Función de las proteínas microtubulares en neuronas
Function of microtubular proteins in neurons
Jesús Ávila de Grado
- 120 Fisiopatología y Terapia de las Enfermedades Neurodegenerativas: Ataxia de Friedreich
Physiopathology and Therapy of Neurodegenerative Diseases: Friedreich's Ataxia
Javier Díaz Nido
- 122 Bases Moleculares de la Plasticidad Neuronal
Molecular Bases of Neuronal Plasticity
Fco. Javier Díez Guerra
- 124 Disfunción Neuronal durante el envejecimiento
Neuronal Dysfunction during aging
Carlos Dotti
- 126 Mecanismos moleculares y celulares de la plasticidad sináptica
Molecular and cellular mechanisms for synaptic plasticity
José Antonio Esteban García
- 128 Bases moleculares de las sinápsis glutamatérgicas
Molecular bases of glutamatergic synapses
Cecilio Giménez Martín / Francisco Zafra
- 130 Lípidos en la fisiología y patología neuronal
Lipids in neuronal physiology and pathology
María Dolores Ledesma Muñoz
- 132 Enfermedad de Huntington y otras enfermedades del sistema nervioso central
Huntington's disease and other CNS disorders
José Lucas
- 134 Biología de células troncales neurales humanas. Potencial para reposición celular y terapia génica en neurodegeneración
Biology of human neural stem cells. Potential for cell and gene therapy in neurodegeneration
Alberto Martínez Serrano
- 136 Señalización mitocondrial del calcio y señalización de insulina/leptina en envejecimiento
Calcium signalling in mitochondria and insulin/leptin signalling during ageing
Jorgina Satrustegui Gil-Delgado
- 138 Bases genéticas de la enfermedad de Alzheimer: Estudio genómico de modelos celulares patogénicos
Genetic bases of Alzheimer's Disease: Genomic study of pathogenic cell models.
Fernando Valdivieso / María Jesús Bullido
- 140 Mecanismos moleculares de neurodegeneración y regeneración
Molecular mechanism of neurodegeneration and regeneration
Francisco Wandosell Jurado

DINÁMICA Y FUNCIÓN DEL GENOMA / Genome Dynamics and Function

- 144 Mantenimiento y variabilidad del genoma: enzimología de la replicación y reparación de DNA
Genome maintenance and variability: enzymology of DNA replication and repair
Luis Blanco Dávila
- 146 Proteínas virales que alteran la expresión génica
Viral proteins that modify gene expression
Luis Carrasco Llamas

UNIDAD DE BIOINFORMÁTICA / Bioinformatics Unit

- 172 Unidad de Bioinformática / Bioinformatics Unit
Ugo Bastolla Bufalini
- 174 Grupo de Modelado Molecular / Molecular Modelling Group
Paulino Gómez-Puertas

DEPARTAMENTO DE CULTURA CIENTÍFICA

- 178 / Science and Society Department
José Antonio López Guerrero

SERVICIOS CIENTÍFICOS / Scientific Facilities

- 182 Animalario / Animal House Facility
Javier Palacín Urquijo
- 183 Servicio de Bioinformática / Bioinformatics Facility
David Abia Holgado
- 184 Servicio de Citometría de Flujo / Flow Cytometry Facility
Berta Raposo Ponce
- 185 Servicio de Fermentación / Fermentation Facility
Dionisio Ureña Rodríguez
- 186 Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva / Genomics and Massive Sequencing Facility
Fernando Carrasco Ramiro
- 187 Servicio de Microscopía Electrónica (SME)
Electron Microscopy Facility (SME)
María Teresa Rojas Marco
- 188 Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)
Optical and Confocal Microscopy Facility (SMOC)
Carlos Sánchez Martín
- 189 Servicio de Química de Proteínas y Proteómica
Proteomics and Protein Chemistry Core Facility
Ana Isabel Marina Ramírez
- 190 Servicio de Transgénesis / Transgenesis Facility
M^a Belén Pintado Sanjuanbenito

SERVICIOS GENERALES / General Services

SEMINARIOS / Seminars

- 198 Lecciones conmemorativas / Memorial Lectures
- 199 Seminarios Severo Ochoa / Severo Ochoa Seminars
- 200 Seminarios del Centro / CBM Seminars
- 202 Seminarios AD-HOC / AD-HOC Seminars

ESCUELA TALLER F.S.O. / F.S.O. Training School

REFLEXIONES DEL DIRECTOR / DIRECTOR'S REMARKS



Santiago Lamas Peláez

DIRECTOR DEL CBMSO / CBMSO DIRECTOR

Tras poco más de un año como director del CBMSO quisiera comenzar expresando mi sentimiento de gratitud y privilegio por tener la oportunidad de servir al Centro durante un período de tiempo. Estoy orgulloso de formar parte de una institución clave de la historia de la biología y biomedicina españolas y de contribuir en la medida de lo posible a su progreso.

A nadie se le escapa que vivimos tiempos difíciles y convulsos, marcados por una situación de severa crisis económica y social que empieza a cronificarse y que permea todos los ámbitos de nuestra sociedad. Ello ha tenido repercusiones importantes sobre el escenario global de financiación de la ciencia y tiene consecuencias inmediatas sobre la viabilidad de muchos proyectos, obligando a reajustes y adaptaciones permanentes, muchas veces en medio de la incertidumbre más densa. Más allá de este diagnóstico que nos obliga a reclutar diariamente fuerzas y espíritu de lucha desde nuestro rincones más íntimos, el CBMSO ha continuado con una actividad científica notable durante el último período, generando publicaciones de alto nivel, registrando nuevas patentes y contribuyendo a la creación de empresas biotecnológicas gracias a la capacidad emprendedora de algunos de sus miembros. Un aspecto esencial es el de la contribución del CBMSO a la formación en todos los períodos de la carrera científica, desde la incorporación de estudiantes en los últimos cursos de grado hasta la formación predoctoral y postdoctoral avanzada.

La naturaleza y singularidad de centro mixto CSIC-UAM, dentro del entorno de excelencia procurado por la UAM, dota a nuestro centro de especial fortaleza a la hora de contribuir a la sociedad en esta vertiente crucial y vertebradora de futuro.

Todo ello se ve reflejado en un elevado número de tesis doctorales, trabajos de fin de máster y desarrollo de prácticas durante la carrera que son albergadas por el CBMSO. Las páginas que suceden inmediatamente a estos comentarios y el contenido detallado de la actividad científica de los departamentos reflejan de manera global y pormenorizada el importante activo del CBMSO.

After little over a year as director of the CBMSO, I would like to begin by expressing my gratitude for the privilege of serving the center. I'm proud to be part of a key institution in the history of Spanish biology and biomedicine and to contribute as much as possible to its progress.

We all know that these are difficult and turbulent times, shaped by a severe economic and social crisis that is becoming chronic and permeates all areas of our society. This crisis has had significant effects globally on the funding of science and immediate effects on the viability of many projects, forcing permanent adjustments and adaptations, often amid a thick fog of uncertainty. In these circumstances that require us daily to draw strength and fighting spirit from our most inner selves, the CBMSO has continued its impressive scientific activity, producing high-level publications, registering new patents and contributing to the creation of biotechnology companies thanks to the entrepreneurial skills of some of its members. An essential aspect of the CBMSO's work is its contribution to training at all stages of the scientific career, from the incorporation of students in their final year of degree to predoctoral and postdoctoral advanced training. The CBMSO's singular nature as a CSIC-UAM joint center, within the environment of excellence created by the UAM, gives our center particular strength in contributing to society in this crucial and unifying aspect of our future. This strength is reflected in the large number of doctoral theses, Masters theses and student internships that are hosted by the CBMSO. The pages following these comments and the detailed descriptions of the departments' scientific activity offer a comprehensive picture of the CBMSO's significant assets.

Scientific activity is under constant scrutiny by scientists themselves, funding agencies and social agents. A few months ago, the CBMSO's Scientific Advisory Board, whose members were proposed by the center and approved by its board, made a long-planned visit to the center. After confirming the CBMSO's quality and high scientific creativity, the committee conducted a comprehensive analysis of the center and had the opportunity to listen to most of the principal investigators providing an overview and some detailed examples of its scientific activity. Here I want to thank the committee members for their work and commitment to this always difficult task, and also reiterate

La actividad científica está sometida a escrutinio permanente por parte de los propios científicos, agencias financiadoras y agentes sociales. Conscientes de ello, hace algunos meses tuvo lugar la visita, prevista desde hace tiempo, del Comité Asesor Externo propuesto por el centro y refrendado por sus patronos. Tras constatar la buena calidad y alta creatividad científicas en el CBMSO, el Comité realizó un análisis global del centro y tuvo la oportunidad de escuchar a la mayoría de los investigadores principales aportando una visión de conjunto y en algunos casos detallada sobre la actividad científica de los mismos. Desde aquí quiero agradecer su trabajo y compromiso en esta tarea siempre ardua y también reiterar mi gratitud a todo el CBMSO por su acogida, comportamiento y profesionalidad durante esta visita. El Centro ha comenzado el proceso de destilación y digestión de las recomendaciones del Comité, que debemos adaptar a nuestra realidad, sin perder de vista el mensaje central: "si los mejores científicos jóvenes no son favorecidos, el CBMSO no sobrevivirá." Esta afirmación, que a muchos puede resultar obvia, es en realidad el nudo gordiano de una transformación y unos retos nada sencillos que escapan en muchos casos a la capacidad de maniobra inherente a un Centro como el nuestro. Pero no hay excusas, debemos hacer todo lo que esté en nuestras manos para facilitar el paso digno de la antorcha, paso que en cualquier actividad nos habilita y justifica como especie.

Inmersos en el agreste panorama de retos, como centro debemos también comprometernos con el desarrollo del campus de excelencia CSIC-UAM, implementando el crecimiento y transformación de las plataformas científico tecnológicas y en la medida de lo posible del polo de biomedicina Madrid-Norte que se está gestando en la zona geográfica del campus. La colaboración y coordinación con el reelegido cuerpo rectoral de la UAM ha sido siempre estrecha y esta convergencia es más necesaria que nunca a la hora de formalizar cualquier acuerdo que repercuta en el desarrollo cualitativo y cuantitativo del CBMSO y del campus en general.

Tocados de lleno por las dificultades y ajustes presupuestarios asistimos a un cambio de ciclo. El CSIC atraviesa momentos difíciles y hace también esfuerzos permanentes no solo por sobrevivir sino por transformarse en una institución que no pierda vigencia en el papel tan significado que lleva jugando en España desde hace más de 70 años. La UAM, persistente en la senda de excelencia desde su nacimiento, no es ajena al panorama de recortes y restricciones, que capea con trabajo, imaginación e inevitables ajustes. Para nosotros como Centro es crítico que estas adaptaciones nos incluyan como uno de los baluartes más emblemáticos de ambas instituciones, no sólo por su historia y la impronta indeleble de sus padres fundadores, sino sobre todo por su realidad y potencialidad. Con frecuencia nos enfrentamos a contradicciones derivadas del antagonismo entre los ideales puros del quehacer científico, las presiones del mercado y la forma de analizar y financiar la actividad científica. La crítica constructiva, la autocrítica, la reflexión, el debate y el análisis son los únicos instrumentos posibles para ir resolviendo, muy paulatinamente, estas contradicciones. Y como el análisis no debe conducir a la parálisis es bueno recordar a Goethe cuando nos dice: "Knowing is not enough; we must apply. Willing is not enough; we must do."

Quiero terminar agradeciendo todo su esfuerzo cotidiano no solo a todo el colectivo de investigadores que hace posible amanecer y anochecer la vida en el centro sino también a todo el personal técnico de los laboratorios, a todos los servicios y a todos los que integran el personal de apoyo de administración, gerencia y dirección por su entrega y eficiencia. Desde mi observatorio privilegiado como director, soy más que nunca consciente de que, aun no habiendo nadie imprescindible, ellos son más imprescindibles que nadie.

my gratitude to all the CBMSO members for their welcoming behavior and professionalism during this visit. The Center has begun the process of distilling and digesting the committee's recommendations, which we must adapt to our reality without losing sight of the central message: "if the best young scientists are not supported, the CBMSO will not survive." This statement, which will be obvious to many, is actually the Gordian knot of a transformation that involves highly complex challenges that in many cases lie beyond the room for maneuver that a Center like ours has. But that is no excuse: we must do everything in our power to facilitate the handing on of the baton, an essential step in any activity that enables and justifies us as a species.

Surrounded as we are by these challenges, we as a center must also commit ourselves to developing the CSIC-UAM campus of excellence, aiding as much as we can the growth and transformation of scientific and technological platforms in the Madrid-North biomedical axis being created in the area of the campus. Collaboration and coordination with the newly re-elected governing team of the UAM body has always been close and this good working relationship is more necessary than ever when it comes to entering into any agreement that affects the qualitative and quantitative development of the CBMSO and the campus in general.

Affected by grave difficulties and budget cuts, we are witnessing a change of cycle. The CSIC is also facing hard times and fighting not only to survive but to transform itself into an institution that does not lose effectiveness in the critical role that it has played in Spain for over 70 years. The UAM, persistent in pursuit of excellence since its inception, is no stranger either to the cuts and restrictions, which it weathers through hard work, creativity and inevitable adjustments. For us as a Center is critical that these adaptations include us as one of the most iconic bastions of both institutions, not only for our history and the indelible imprint of our founding fathers, but above all for our reality and potential. Often we face contradictions derived from the antagonism between the pure ideals of science and market pressures and how scientific activity is evaluated and funded. Constructive criticism, self-criticism, reflection, discussion and analysis are the only possible tools to resolve, very gradually, these contradictions. And as analysis should not lead to paralysis, we would do well to remember what Goethe says: "Knowing is not enough; we must apply. Willing is not enough; we must do."

I want to end by thanking for their daily efforts not only all the researchers who give life to the center but also all the laboratories' technical staff, all the service staff and all those who make up the administrative and managerial staff for their dedication and efficiency. From my privileged observation point as director, I am more than ever aware that, while no one is indispensable, they are more indispensable than anyone else.

ORGANIZATIONAL STRUCTURE



Santiago Lamas Peláez CBMSO DIRECTOR



Francisco Zafra Gómez CBMSO VICE-DIRECTOR



INSTITUTEDIRECTORS

César de Haro Castella

DIRECTOR OF THE INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR "ELADIO VIÑUELA" (CSIC)



José Berenguer Carlos

DIRECTOR OF THE INSTITUTO UNIVERSITARIO
DE BIOLOGÍA MOLECULAR (UAM)

DEPARTMENTDIRECTORS



Balbino Alarcón Sánchez

DEPARTMENT OF
CELL BIOLOGY AND
IMMUNOLOGY



Luis Menéndez Arias

DEPARTMENT OF
VIROLOGY AND
MICROBIOLOGY



Paola Bovolenta Nicolao

DEPARTMENT OF
DEVELOPMENT AND
DIFFERENTIATION



José A. Esteban García

DEPARTMENT OF
MOLECULAR
NEUROBIOLOGY



Crisanto Gutiérrez Armenta

DEPARTMENT OF
GENOME DYNAMICS
AND FUNCTION

SCIENTIFIC ADVISORY BOARD (SAB)



Prof. Hans-Georg Kraeusslich, Chair
Department of Infectious Diseases, Virology
University Hospital Heidelberg
Heidelberg, Germany



Dr. Carlos Belmonte
Cellular and Systems Neurobiology Unit
Instituto de Neurociencias Universidad Miguel
Hernández-CSIC
Alicante, Spain



Dr. Hergen Spits
Tytgat Institute for Liver and Intestinal Research
University of Amsterdam
Amsterdam, The Netherlands



Dr. Vivek Malhotra
Cell and Developmental Biology Programme
Centro de Regulación Genómica
Barcelona, Spain



Dr. Anne Ephrussi
Developmental Biology Unit
European Molecular Biology Laboratory
Heidelberg, Germany



Dr. Matthias W. Hentze
Gene Expression Programme
European Molecular Biology Laboratory
Heidelberg, Germany



Dr. John Diffley
Cancer Research UK London Research Institute
London, United Kingdom



Dr. Waldemar Vollmer
The Centre for Bacterial Cell Biology
Newcastle University Medical School
Newcastle upon Tyne, United Kingdom



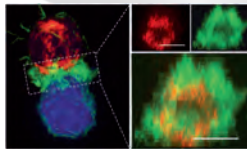
Dr. Matthew Freeman
Sir William Dunn School of Pathology
University of Oxford
Oxford, United Kingdom



Dr. Reinhard Faessler
Department of Molecular Medicine
Max Planck Institute of Biochemistry
Martinsried, Germany

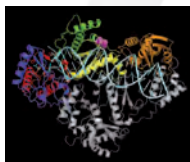


CBMSO DEPARTMENTS



CELL BIOLOGY
AND
IMMUNOLOGY

19
Groups



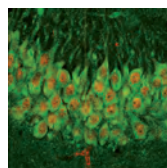
VIROLOGY
AND
MICROBIOLOGY

15
Groups



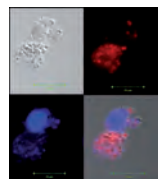
DEVELOPMENT
AND
DIFFERENTIATION

13
Groups



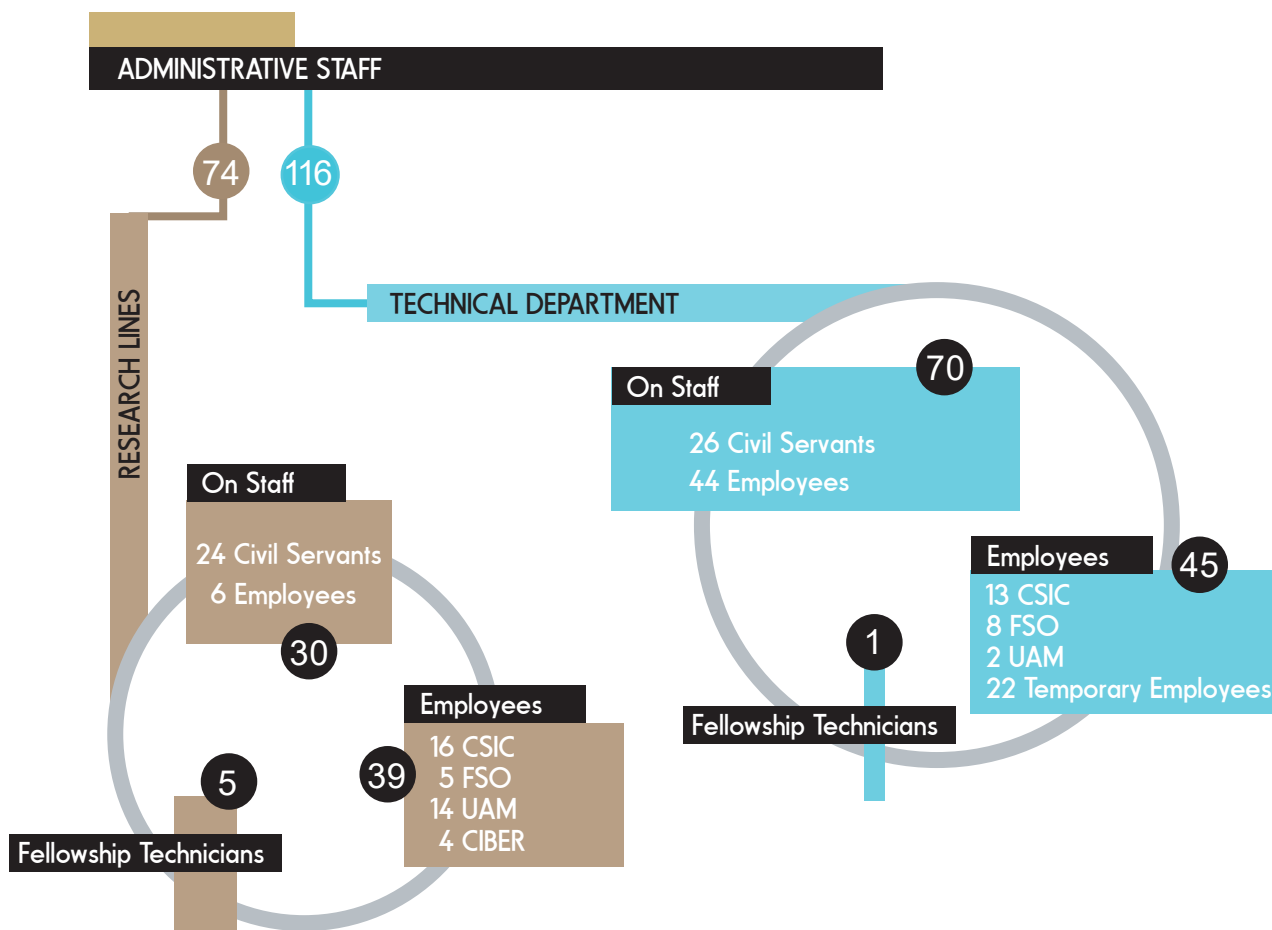
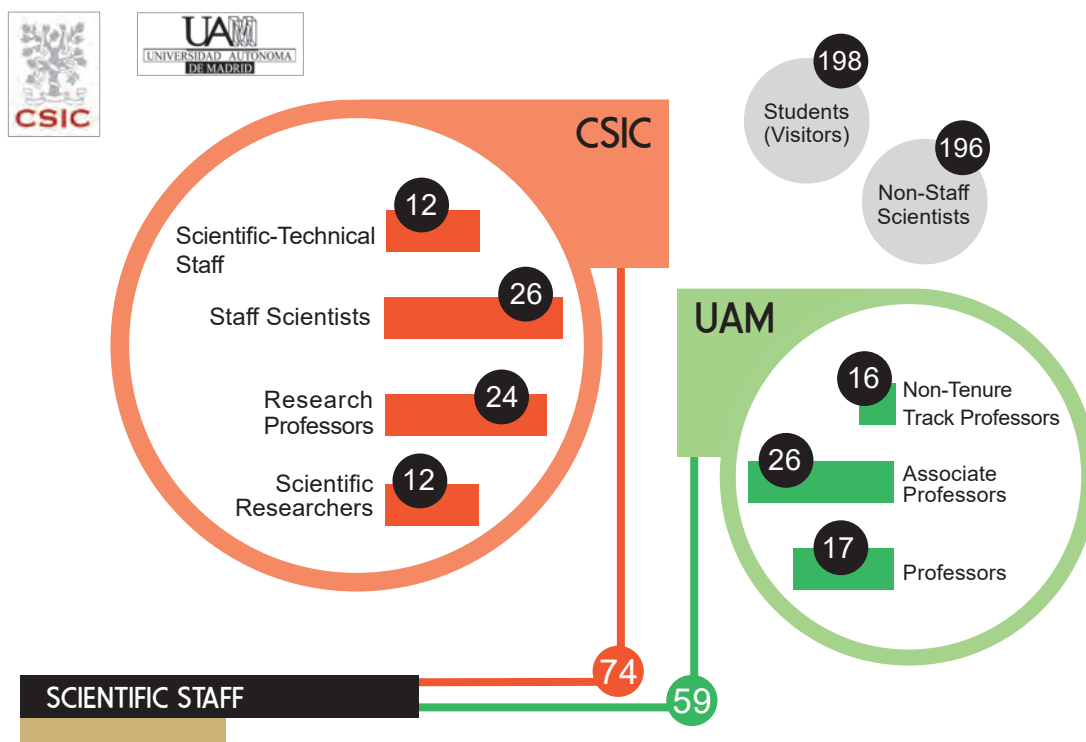
MOLECULAR
NEUROBIOLOGY

13
Groups

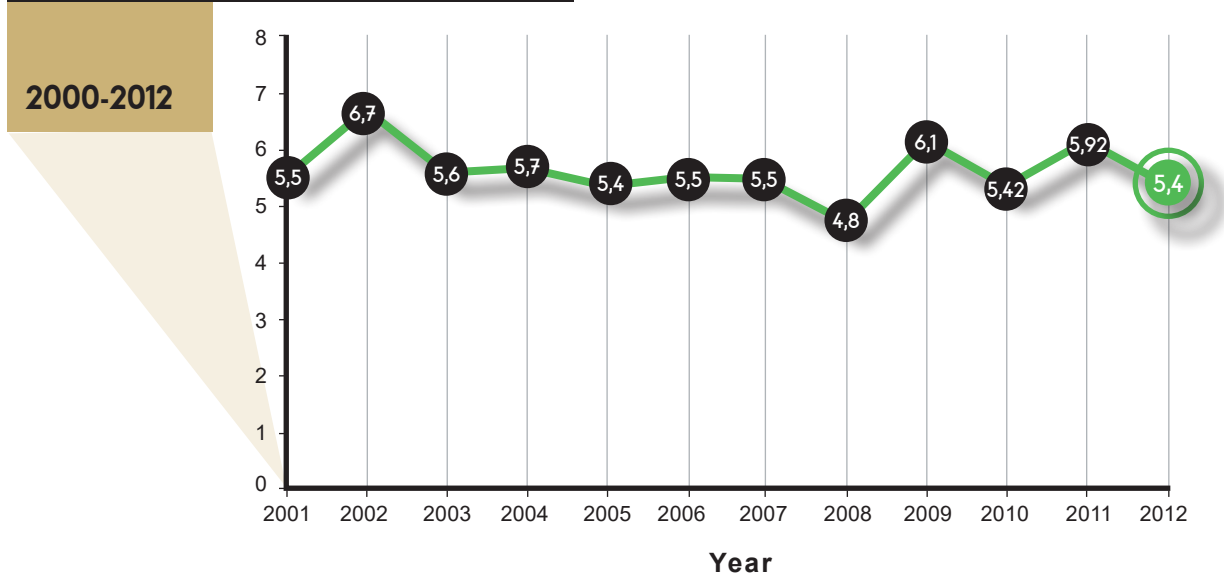


GENOME
DYNAMICS
AND FUNCTION

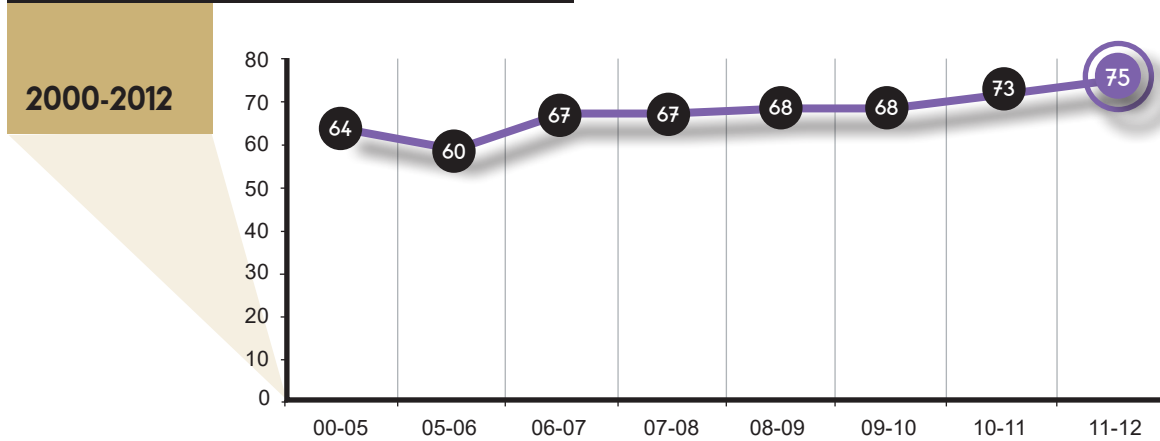
13
Groups



AVERAGE IMPACT FACTOR



RESEARCH LINES



2011	MARGARITA SALAS FALGUERAS	Doctor Honoris Causa of the UNED Doctor Honoris Causa of the Universidad Menéndez Pelayo Honorary Membership Award of the Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid
	JOSÉ ANTONIO LÓPEZ GUERRERO	Scientific Dissemination Award: Blogs madri+d
	M^a JESÚS BULLIDO GÓMEZ-HERAS	Ramón y Cajal Prize for Basic Research Best Patent, madri+d 2010 Contest
	ESTEBAN DOMINGO SOLANS	Ranking Member of the Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
	CARMEN ARAGÓN RUEDA	Corresponding Member of the Real Academia de Farmacia

AWARDS AND HONORS

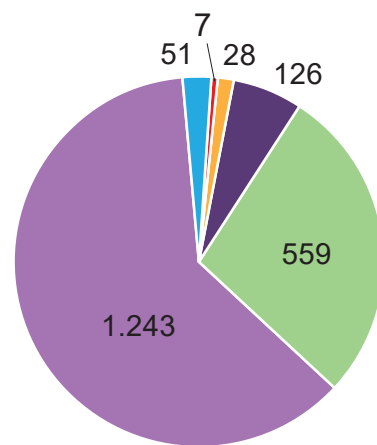
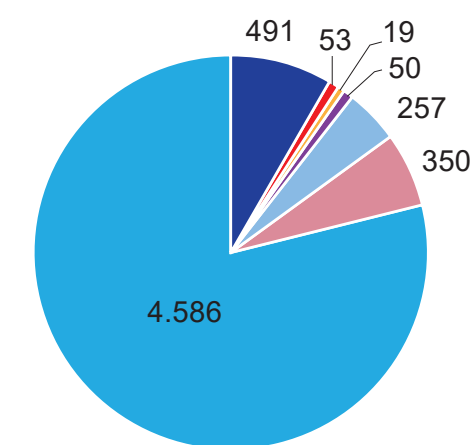
2012	MARGARITA SALAS FALGUERAS	Doctor Honoris Causa of the Universidad de Jaén Clara Campoamor Prize of the Ayuntamiento de Madrid Margarita Salas Research Award of the Fundación Universidad de Málaga
	PAOLA BOVOLENTA	Elected member of EMBO Fundaluce Prize
	CECILIO GIMÉNEZ MARTÍN	Corresponding Member of the Real Academia de Farmacia
	JOSÉ FERNÁNDEZ PIQUERAS	Coordinator, Biomedicine Area, National Evaluation and Foresight Agency Member of various ethics committees (CSIC-CBMSO)
	MARÍA LUISA TORIBIO	Second Paula Estévez Fellowship of the Fundación Santa Ibarra

TOTAL CBMSO STAFF HONORS

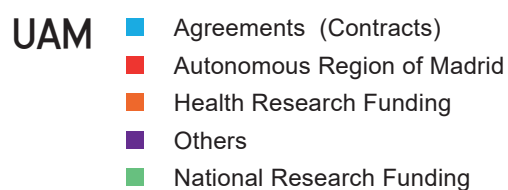
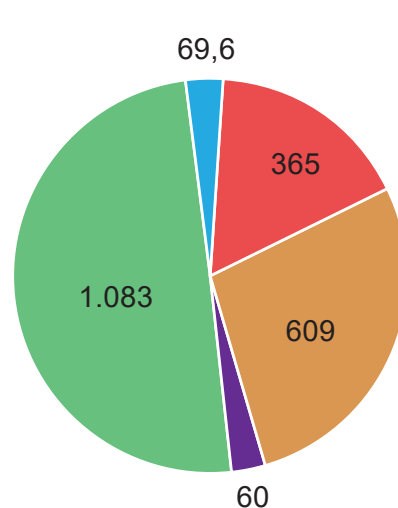
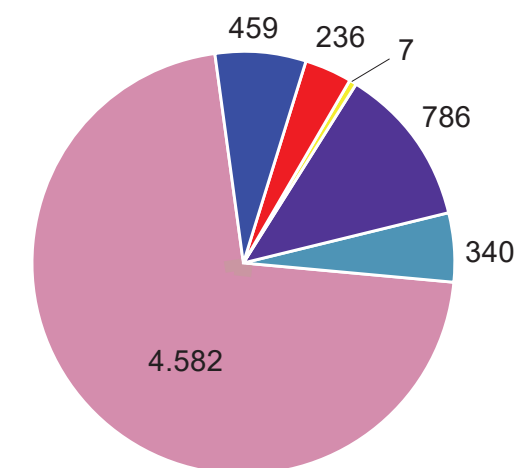
- 2 Laureates of the Príncipe de Asturias de Investigación
- 3 Laureates of the Premio México de Investigación (of 19 in total)
- 3 Laureates of the Premio Jaime I de Investigación
- 5 Laureates of the Ramón y Cajal National Prize
- 17 Doctors "Honoris causa" of Spanish and foreign universities
- 2 members of the USA's National Academy of Sciences
- 9 Spanish Royal Academies members

FINANCING: OVERALL DATA (*)

2011



2012



* Figures in thousand of euros

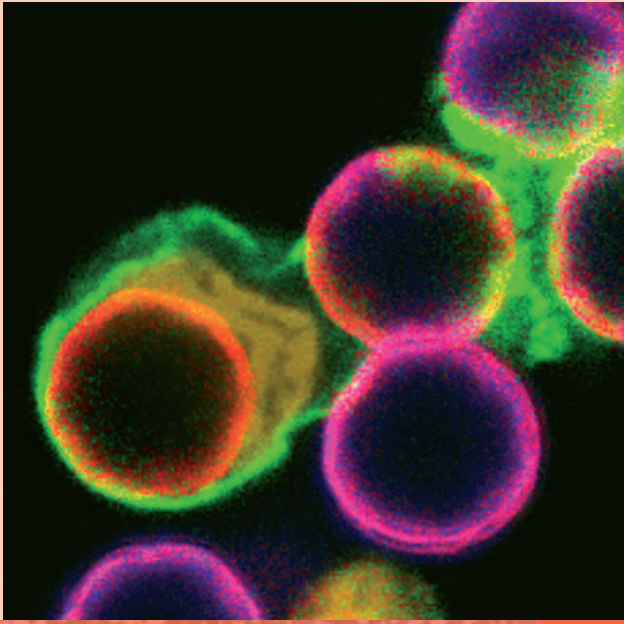
SCIENTIFIC/TECHNICAL DEPARTMENTS

Animal House Facility
Bioinformatics Facility
Electron Microscopy Facility
Fermentation Facility
Flow Cytometry Facility
Genomics Facility
Optical and Confocal Microscopy Facility
Proteomics and Protein Chemistry Core Facility
Transgenesis Facility

ADMINISTRATIVE DEPARTMENTS

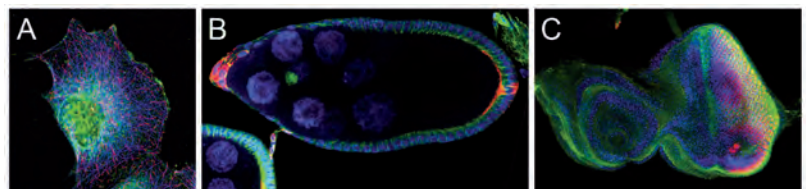
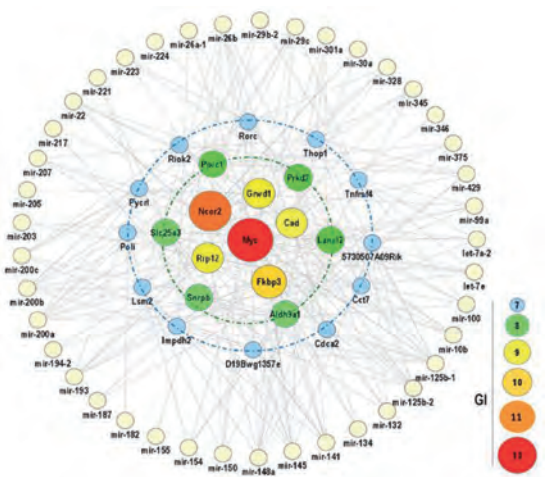
Administration
Biological Security
Cell Culture, Washing and Sterilization
Computing
Graphic Design
Institutional Relations
Instruments and Equipment
Library
Maintenance
Management
Management Board
Personnel Management
Photography
Purchase Department
Reception
Safety and Occupational Risk Prevention

- 16 Transmisión de señales a través del receptor para el antígeno de células T
Signal transduction through the T cell antigen receptor
Balbino Alarcón Sánchez
- 18 Polaridad Celular
Cell Polarity
Miguel A. Alonso Lebrero
- 20 Glicogenómica Funcional
Functional Glycogenomics
Pedro Bonay Miarons
- 22 Interacciones funcionales entre la tetraspanina CD9 y moléculas de adhesión celular
Functional interactions between tetraspanin CD9 and cell adhesion molecules
Carlos Cabañas Gutiérrez
- 24 Interacción entre el citoesqueleto y la membrana plasmática
Cytoskeleton-plasma membrane interactions
Isabel Correas Hornero
- 26 Inmunología Viral
Viral Immunology
Margarita del Val Latorre
- 28 Susceptibilidad Genética en Enfermedades complejas: genes implicados en el desarrollo de linfomas linfoblásticos T
Genetic susceptibility in complex diseases: genes involved in T-cell lymphoma development
José Fernández-Piqueras
- 30 Mediadores proinflamatorios y su implicación en enfermedades de etiología inflamatoria e inmune
Proinflammatory mediators and their involvement in immune and inflammatory-mediated diseases
Manuel Fresno Escudero
- 32 Acciones de los prostanoides en procesos inflamatorios
Prostanoids actions in Inflammatory Processes
Miguel Ángel Íñiguez Peña
- 34 Células troncales tumorales
Cancer Stem Cells
Marta Izquierdo Rojo
- 36 Fisiopatología Molecular del Endotelio Vascular
Molecular pathophysiology of the vascular endothelium
Santiago Lamas Peláez
- 38 Papel de la transición epitelio-mesénquima de las células mesoteliales en fibrosis y cáncer
Role of the epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells in fibrosis and cancer
Manuel López Cabrera
- 40 Mecanismo de asociación de HLA-B27 con espondiloartropatías (JALC)
Mechanism of association of HLA-B27 with spondyloarthropathies (JALC)
José A. López de Castro
- 42 Laboratorio de polaridad epitelial
Epithelial polarity laboratory
Fernando Martín Belmonte
- 44 Receptores acoplados a proteínas G: redes de señalización e implicaciones fisiopatológicas
G protein-coupled receptor networks: signal transduction and pathophysiological implications
Federico Mayor
- 46 Mecanismos moleculares de interacción virus-célula: el modelo del virus de la peste porcina africana
Virus Cell Interaction. The ASFV Model
Yolanda Revilla Novella
- 48 Homeostasis metabólica
Metabolic homeostasis
Ignacio V. Sandoval
- 50 Óxido nítrico y respuesta inmune adaptativa: regulación y función de la actividad óxido nítrico sintasa en la activación y diferenciación de los linfocitos T
Nitric oxide and adaptive immune response: regulation and function of nitric oxide synthase activity in the activation and differentiation of T lymphocytes
Juan Manuel Serrador Peiró
- 52 Desarrollo del sistema linfohematopoyético humano
Development of the human lymphohematopoietic system
María Luisa Toribio García



BIOLOGÍA CELULAR E INMUNOLOGÍA

Cell Biology and Immunology



Transmisión de señales a través del receptor para el antígeno de células T

Signal transduction through the T cell antigen receptor



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Balbino Alarcón Sánchez

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Hisse M. van Santen
Aldo Borroto Revuelta

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Raquel Blanco Fuentes
Elena Fernández-Arenas Hervás
Diana Reyes Garau

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Enrique Calleja Sierra
Pilar Mendoza Daroca
Ana Martínez Riaño

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Valentina Blanco Ferreras
Irene Arellano Rojo
Tania Gómez Aranda
Cristina Prieto Carro

Resumen de investigación

El reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T sorprende por su sensibilidad (son activados por unas decenas de moléculas de antígeno), por ser muy específicos (son activados por péptidos antigénicos que difieren en un único aminoácido de péptidos que son ignorados) y por presentar un amplio rango dinámico (las concentraciones de antígeno necesarias para la saturación de la respuesta son frecuentemente de 5 a 8 órdenes de magnitud superiores a las que inician la señal más débil). Estas propiedades en el reconocimiento de antígeno las ejercen a través de un receptor (el TCR) que presenta una afinidad baja por su ligando (el péptido antigénico unido a MHC), típicamente entre 1 y 10 μM . Creemos que la solución a esta paradoja se encuentra en que el TCR no actúa como una molécula aislada sino que se expresa, antes de la estimulación con antígeno, como oligómeros de distinto tamaño que pueden llegar a ser hasta de 20 TCRs.

La organización del TCR en oligómeros puede dotar a los linfocitos T de una mayor avidez en el reconocimiento de antígeno y además permitir fenómenos de cooperatividad entre TCRs. De hecho, hemos demostrado que la unión de un ligando a un TCR resulta en la transmisión de un cambio conformacional a los TCRs no ligados. Por otro lado, estamos investigando los mecanismos intramoleculares de transmisión de señales desde las subunidades que reconocen el ligando a las que reclutan proteínas efectoras en el citoplasma.

Finalmente, estamos estudiando el papel de la GTPasa TC21, de la familia RRas, en procesos fisiológicos de los linfocitos como la señalización homeostática, formación de la sinapsis inmunológica, selección tímica, formación de centros germinales, así como en procesos patológicos: participación en la formación de linfomas B y T, además de cáncer de pulmón y mama.

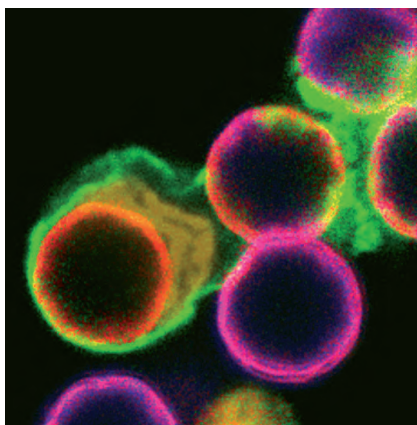


Figura 1. La estimulación del TCR promueve un proceso fagocítico dependiente de TC21 y RhoG. Las células T son capaces de fagocitar microesferas de látex recubiertas de anti-CD3. Linfocitos primarios naïf de ratón fueron incubados con microesferas de 6 μm fluorescentes (en naranja) durante 30 min y fueron teñidas con faloidina fluorescente (en verde) para visualizar la F-actina cortical. Se muestra una sección óptica para ilustrar que algunas microesferas fueron internalizadas completamente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón marcado con Alexa 647 (en magenta) para determinar qué microesferas eran accesibles al medio exterior. Esto permitió distinguir microesferas completamente internalizadas (cabezas de flecha) de las exteriores e incluso demostrar la presencia de copas fagocíticas (flechas) en las cuáles la microesfera está parcialmente inaccesible al anticuerpo secundario.

Figure 1. TCR-triggered TC21- and RhoG-dependent T cell phagocytosis. T cells phagocytose anti-CD3-coated latex beads. Primary mouse naïve T cells were incubated with 6 μm diameter fluorescent beads (shown in orange) for 30 min and stained with fluorescent phalloidin to visualize the cortical F-actin (in green). An optical section is shown to illustrate that some beads are completely internalized. A secondary Alexa 647-labeled anti-mouse Ig (shown in magenta) was added to determine if the beads were accessible or not. This enabled us to distinguish fully internalized (arrowheads) from external beads, and even to define the presence of phagocytotic cups (arrows) in which the bead is partly inaccessible to the secondary antibody.

Research summary

The properties of antigen recognition by T cells are remarkable from several points of view: T cells are highly sensitive (respond to a few antigen molecules), T cells are highly specific (respond to antigen peptides that differ in only one amino acid from null peptides), and T cells present a wide dynamic range (their response becomes often saturated only after increasing 5-8 orders of magnitude the concentration of antigen). These properties rely on the use of a receptor (the TCR) with low affinity for antigen, typically of 1-10 μM . We believe the solution to this paradox is found in the organization of the TCR in the membrane: the TCR is organized in pre-existing oligomers of up to 20 TCR complexes, before its encounter with antigen.

The oligomeric organization of the TCR can endow T cells with a higher avidity for antigen and the possibility of cooperation between TCRs. Indeed, we have demonstrated that a conformational change resulting from the binding of a TCR complex to its ligand is propagated to unbound TCRs. In addition, we are investigating the intramolecular mechanisms that allow the transmission of signals from the ligand-binding subunits to the cytoplasmic tails of the signal transducing subunits in the TCR.

Finally, we are studying the role TC21, a member of the RRas subfamily of GTPases, in physiological processes of T and B lymphocytes such as homeostatic control of the populations, formation of the immunological synapse, thymic selection, germinal center formation, as well as in pathological processes such as formation of T and B cell lymphomas, lung and breast cancer.

Publicaciones / Publications

Iborra, I., Soto, M., Stark-Aroeira, L., Castellano, E., Alarcón, B., Alonso, C., Santos, E., and Fernández-Malavé, E. (2011). H-ras and N-ras are dispensable for T-cell development and activation but critical for protective Th1 immunity. *Blood* **117**, 5102-5111.

Martínez-Martin, N., Fernández-Arenas, E., Cemerski, S., Delgado, P., Turner, M., Heuser, J., Irvine, D.J., Huang, B., Bustelo, X.R., Shaw, A.S., and Alarcón, B. (2011). TCR internalization from the immunological synapse mediated by TC21- and RhoG GTPase-dependent phagocytosis. *Immunity* **35**, 208-222.

Kumar, R., Ferez, M., Swamy, M., Arechaga, I., Rejas, M., Valpuesta, J.M., Schamel, W.W.A., Alarcon, B., and van Santen, H.M. (2011). Increased sensitivity of antigen-experienced T cells via enrichment for oligomeric TCR complexes. *Immunity* **35**, 375-387.

Alarcón, B., Mestre, D. and Martínez-Martin, N. (2011). The Immunological Synapse: a Cause or Consequence of TCR triggering?. *Immunology* **133**, 420-425.

Martín-Cófreces, N., Alarcón, B. and Sánchez-Madrid, F. (2011). Tubulin and actin interplay at the T cell and Antigen-presenting cell interface. *Frontiers Immunol* **2**, 24.

Alarcon, B. and Martinez-Martin, N. (2012). RRas2, RhoG and T cell phagocytosis. *Small GTPases* **3**:2, 1-5.

Larive, R.M., Abad, A., Cardaba, C.M., Hernández, T., Cañamero, M., De Alava, E., Santos, E., Alarcon, B. and Bustelo, X.R. (2012). The Ras-like protein RRas2/TC21 is important for proper mammary gland development. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2373-2387.

Martín-Cófreces, N.B., Baixauli, F., Gil, D., Monjas, A., Hellriegel, C., López, M.J., Alarcón, B. and Sánchez-Madrid, F. (2012). End-binding protein 1 controls signal propagation from the T cell receptor. *EMBO J.* **31**, 4140-4152.

Blanco, R. and Alarcón, B. (2012). TCR nanoclusters as the framework for transmission of conformational changes and cooperativity. *Frontiers Immunol* **3**, 115.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Nuria Martínez Martín (2011). Caracterización de una ruta fagocítica mediada por el TCR en linfocitos T. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Balbino Alarcón.

Figura 2. Prevención de la inflamación de las vías respiratorias bajas por el compuesto de bajo peso molecular Ecra4h que inhibe la interacción TCR-Nck. Ecra4h inhibe la infiltración de las vías respiratorias por células inflamatorias en ratones sensibilizados con ovalbúmina en experimentos de Tomografía Molecular de Fluorescencia con la sonda ProSense 680 24 horas tras la exposición a un aerosol de ovalbúmina. El grupo de ratones tratados con Ecra4h recibió dos dosis de Ecra4h-HCl (1 mg, i.p.) en los tiempos de inmunización. El grupo placebo fue tratado sólo con el solvente y el grupo control no fue inmunizado con ovalbúmina. Cortesía de la Dra. Pilar Martín, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares.

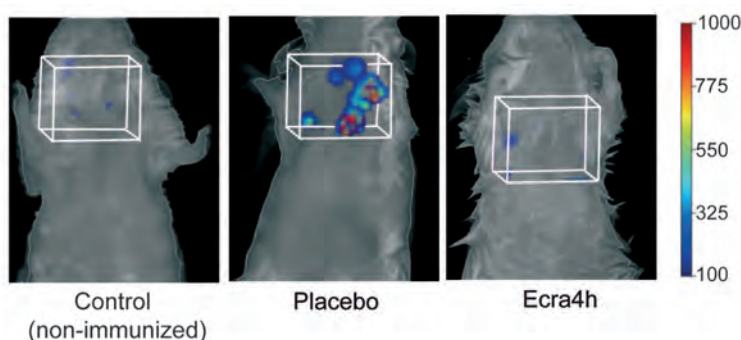


Figure 2. Prevention of allergic airway disease by the small molecular weight inhibitor of the TCR-Nck interaction Ecra4h. Ecra4h inhibits infiltration of airways by inflammatory cells in ovalbumin-sensitized mice, as measured by Fluorescence Molecular Tomography using the ProSense 680 probe 24 h after exposure to an aerosol of ovalbumin. A colorimetric scale was used to quantify the degree of infiltration. The Ecra4h group was administered two doses of Ecra4h-HCl (1 mg, i.p.) at the time of immunization, while the placebo group was treated with the vehicle alone and the control group was not immunized with ovalbumin. Courtesy of Dr. Pilar Martín, National Center for Cardiovascular Diseases.

Polaridad Celular

Cell Polarity



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Miguel A. Alonso Lebrero

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Olga M. Antón Hurtado
Laura Andrés Delgado
Elena Reales Rodríguez
Juan Francisco Aranda Gómez

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:*
Leandro N. Ventimiglia
Sandra Ballester Beltrán
Miguel Bernabé Rubio

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
Laura Barba Moreno

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:
Alberto Jiménez García
Juan Antonio Rodríguez Gutiérrez

Resumen de investigación

La polaridad celular es fundamental para el funcionamiento normal de la mayoría de los tipos celulares. El objetivo de nuestro grupo es comprender mejor el proceso de polarización celular mediante la caracterización funcional de proteínas implicadas en procesos de transporte vesicular polarizado. Para ello utilizamos como sistemas celulares modelo células hepáticas, linfocitos T y células epiteliales polarizadas. En estos estudios ponemos un énfasis especial en la caracterización funcional de las rutas de transporte especializadas mediadas por miembros de la familia MAL de proteínas.

MAL, el miembro fundador de la familia MAL de proteínas, fue descrito previamente como un componente de la maquinaria para el funcionamiento de rutas especializadas de transporte de células epiteliales polarizadas y de linfocitos T. Hace años propusimos que MAL podría organizar los lípidos de las balsas de membrana para hacerlas competentes en la captación de moléculas específicas para su transporte a la superficie apical en las células epiteliales o de la tirosina quinasa Lck en los linfocitos T. Uno de nuestros logros en los últimos dos años ha sido demostrar que la proteína MAL organiza los lípidos de las balsas en la sinapsis inmunológica (SI) de los linfocitos T asegurando así la localización correcta de moléculas asociadas a las balsas, como es el caso de Lck y LAT, a la SI. En apoyo de un papel más general para las proteínas de la familia MAL en la organización de las balsas de membrana, hemos encontrado también que la proteína MYADM, un miembro de la familia MAL, organiza las balsas para la captación de Rac1, regulando así el proceso de migración celular.

La polarización del aparato secretor de los linfocitos T requiere de la reorientación del centrosoma a la SI. Otro logro importante de nuestro grupo en este periodo ha sido el hallazgo de que la formina INF2, descrita anteriormente como una proteína que interacciona con MAL, controla este proceso mediante la formación de una red especializada de microtúbulos detirosinados.

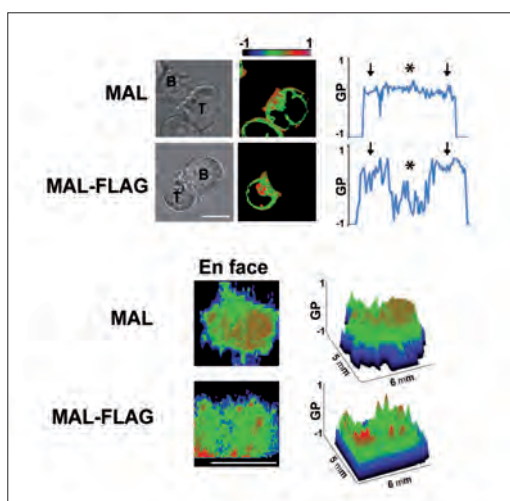


Figura 1. Células Jurkat MAL y células Jurkat MAL-FLAG marcadas con la sonda fluorescente Laurdan fueron conjugadas a células presentadoras de antígeno en presencia de superantígeno SEE (paneles superiores izquierdos). Los gráficos representan los valores de polarización general (GP) a lo largo de la SI (línea blanca en las imágenes de contraste de fases) para cada tipo de célula Jurkat (paneles superiores derechos). La flecha indica la periferia de la SI y el asterisco la zona central. Se muestra en falso color una vista frontal de la SI (paneles inferiores izquierdos) y un histograma tridimensional de los valores de GP obtenidos (paneles inferiores derechos).

Figure 1. Jurkat MAL and Jurkat MAL-FLAG cells were labeled with the fluorescent probe Laurdan and then conjugated to SEE-loaded antigen-presenting cells (top, left panels). The graphics represent the generalized polarization (GP) values along the IS (white line in the differential contrast images) for each type of Jurkat cell (top, right panels). The arrows point to the IS periphery and the asterisk indicates the central region. An en face view of the IS is shown in pseudocolor (bottom, left panels). A three dimensional histogram of the GP values at the IS is also presented (bottom, right panels).

Research summary

Cell polarity is fundamental to the functioning of most types of cell. Our group's aim is to advance our knowledge of the cell polarization process through the functional characterization of protein machinery involved in the generation and maintenance of cell polarization. Hepatocytes, T lymphocytes and epithelial cells are our preferred model cell systems. Special emphasis is placed on the functional characterization of the specialized transport pathways mediated by members of the MAL protein family and associated proteins in these cell types.

MAL, the founder member of the MAL family, was previously identified as a component of the machinery for specialized pathways of raft-mediated vesicular transport in polarized epithelial cells and T lymphocytes. MAL was postulated to organize raft lipids to make raft membranes competent for the recruitment of specific cargo during transport of apical proteins in epithelial cells or of the tyrosine kinase Lck in T cells. One of our major achievements in the last two years has been the discovery that MAL organizes raft membranes at the immunological synapse (IS) of T lymphocytes for the correct targeting of the raft-associated Lck and LAT molecules to the supramolecular activation cluster assembled at the IS. As evidence of a more general role of MAL family proteins in raft organization, we have also found that MYADM, a member of the MAL family, organizes raft lipids for Rac1 recruitment with subsequent repercussion in the regulation of cell migration.

The reorientation of the centrosome to the IS, which is required for the polarization of the secretory apparatus, is one of the hallmarks of T cell polarization. Another important achievement of our group in this period has been the discovery that formin INF2, which interacts with MAL, mediates this process through the formation of a specialized array of stable detirosinated microtubules.

Publicaciones / Publications

Andrés-Delgado, L., Antón, O. M., Bartolini, F., Ruíz-Saénz, A., Correas, I., Gundersen, G.G., and Alonso, M.A. (2012) INF2 promotes the formation of detirosinated microtubules necessary for reorientation of the centrosome to the immunological synapse of T cells. *J. Cell Biol.* **198**, 1025-1037.

Rodríguez-Fraticelli, A.E., Auzan, M., Alonso, M.A., Bornens, B., and Martín-Belmonte, F. (2012) Cell-confinement controls epithelial polarity and lumen formation through cortical actin contractility and LKB1 in micropatterned MDCK 3D-cultures. *J. Cell Biol.* **198**, 1011-1023.

Zhou, G., Liang, F.X., Rok, R., Wang, Z., Liao, Y., Ghiso, J., Luque-Garcia, J.L., Neubert, T.A., Kreibich, G., Alonso, M.A., Schaeren-Wiemers, N., and Sun, T.T. (2012) MAL mediates the incorporation of exocytic uroplakin-delivering vesicles into the apical membrane of urothelial umbrella cells. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1354-1366.

Dorman, D.M., Shahsafari, A., and Alonso, M.A. (2012) Utility of CD200 immunostaining in the diagnosis of primary mediastinal large B cell lymphoma: comparison with MAL, CD23, and other markers. *Mod. Pathol.* **25**, 1637-1643.

Ruiz-Saenz, A., Kremer, L., Alonso, M.A., Millán, J., and Correas, I. (2011) Protein 4.1R regulates cell migration and IQGAP1 recruitment to the leading edge. *J. Cell Sci.* **124**, 2529-2538.

Aranda, J.F., Reglero-Real, N., Marcos-Ramiro, B., Ruíz-Saénz, A., Bernabé-Rubio, M., Correas, I., Millán, J., and Alonso, M.A. (2012) MYADM, a member of the MAL protein family, regulates Rac1 targeting to membrane rafts and cell migration. In J. Becerra, J. and Santos-Ruiz, L. (Eds.) *Hot Topics in Cell Biology*. Chartridge Books Oxford, Oxford, UK, pp. 36-42.

Boyer, O., Nevo, F., Plaisier, E., Funalot, B., Gribouval, O., Benoit, G., Huynh-Cong, E., Arrondel, C., Tête, M.J., Montjean, R., Richard, L., Karras, A., Pouteil-Noble, C., Balafrej, L., Bonnardeaux, A., Canaud, G., Charasse, C., Dantal, J., Deschenes, G., Deteix, P., Dubourg, O., Petiot, P., Pouthier, D., Leguenn, E., Guiochon-Mantel, A., Broutin, I., Gubler, M.C., Saunier, S., Ronco, P., Vallat, J.M., Alonso, M.A., Antignac, C., and Mollet, G. (2011) INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2377-2388.

Aranda, J.F., Reglero-Real, N., Kremer, L., Marcos-Ramiro, B., Ruíz-Saénz, A., Calvo, M., Enrich, C., Correas, I., Millán, J., and Alonso, M.A. (2011) MYADM regulates Rac1 targeting to ordered membranes required for cell spreading and migration. *Mol. Biol. Cell.* **22**, 1252-1262.

Antón, O.M., Andrés-Delgado, L., Reglero-Real, N., Batista, A., and Alonso, M.A. (2011) MAL protein controls protein sorting at the supramolecular activation cluster of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **186**, 6345-6356.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Laura Andrés Delgado (2011). La forma INF2 regula el transporte de Lck y la reorientación del centrosoma a la sinapsis inmunológica de los linfocitos T. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Miguel. A. Alonso.

Premios / Awards

Premio PINP 2011 al mejor trabajo publicado realizado en el CBMSO a la Dra. Laura Andrés Delgado / PINP 2011 award to the best article carried out at the CBMSO to Dr. Laura Andrés Delgado.

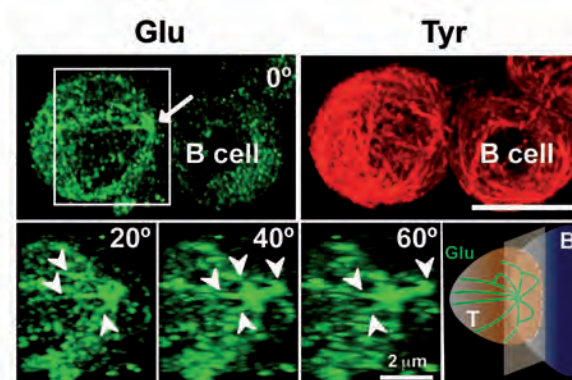


Figure 2. Se tiñeron distintos conjugados de células T con células presentadoras de antígeno para microtúbulos detirosinados (Glu, verde) y tirosinados (Tyr, rojo). Se muestran diferentes vistas de la distribución de los microtúbulos Glu en el contacto célula-célula de uno de los conjugados rotado 0, 20, 40 y 60 grados. La flecha indica la posición del centrosoma y las cabezas de flecha apuntan a distintos microtúbulos detirosinados que se doblan alejándose de la SI y siguen la curvatura celular.

Figure 2. Conjugates formed by T cells with SEE-loaded antigen-presenting cells were stained for detirosinated (Glu, green) and tyrosinated (Tyr, red) microtubules. Views of the cell-to-cell contact rotated 0, 20, 40 and 60 degrees are shown for Glu-MT-stained T cells in one conjugate. The arrow indicates the position of the centrosome and the arrowheads point to Glu-MTs that bend away from the IS following the T cell curvature.

Glicogenómica Funcional

Functional Glycogenomics



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Pedro Bonay Miarons

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Manuel Soto Álvarez
Carlos Alonso Bedate

Becarios / Contratados Predoctorales /
Graduate Students:
Laura Corvo Villen
Laura Ramírez García
María Vega Sendino
Leticia Olabarri
Francisco Zorita
Francisco Dorado
Ana Uribarri

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Libertad Teresa Matamoros

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Manoel Barral-Neto
Aldina Barral
Claudia Brodskyn
Leo Arruda
Fundação Oswaldo Cruz
(FIOCRUZ) Centro de Pesquisas
Gonzalo Moniz, Bahia, Brasil
Elizabeth Ferrer
Universidad de Carabobo
Maracay, Venezuela

Resumen de investigación

El laboratorio tiene como objetivo fundamental el entender como el sistema inmune innato reconoce patógenos mediante los receptores de superficie – básicamente los CLRs o lectinas tipo C y galectinas- de las células involucradas, principalmente Células Dendríticas. En el curso del último año hemos desarrollado un sistema de estudio que comprende el complemento completo (hasta el momento) de todas las proteínas de reconocimiento de glicanos (humano y murino) inmovilizadas en formato microarray que nos permitirá obtener una instantánea de cómo un determinado patógeno es “visto” por el sistema inmune. Los resultados de estudios empleando este sistema pueden proveer claves predictivas en cuanto a polarización de la respuesta inmune generada frente a un patógeno en particular. Un segundo objetivo es definir las rutas de señalización/transducción inducidas en células presentadoras de antígenos por la interacción de lectinas tipo C y galectinas con sus haptenos glicanos. Conocer la naturaleza de tales rutas es esencial en la identificación de moléculas del patógeno que actúen como reguladores/moduladores inmunes y dianas terapéuticas potenciales en el desarrollo de nuevos anti-inflamatorios.

En tercer lugar, se propone definir como las lectinas tipo C del huésped son capaces de inducir diferentes programas de activación celular que conducen a una disminuida respuesta pro-inflamatoria a ligandos TLR. En particular, se está estudiando cual combinación de lectinas tipo C/galectinas-TLR es requerida para una determinada respuesta inmune. Es decir, ligandos glicanos obtenidos de patógenos podrían ser usados como adyuvantes Th1 o Th2?. Una aproximación que permitiría responder esta pregunta, es intentar direccionar la interacción de antígenos previamente demostrados con cierta actividad protectora de *Leishmania sp.* hacia Células Dendríticas de piel mediante su fusión a ligandos de CLRs con el objeto de estimular una respuesta inmune específica.

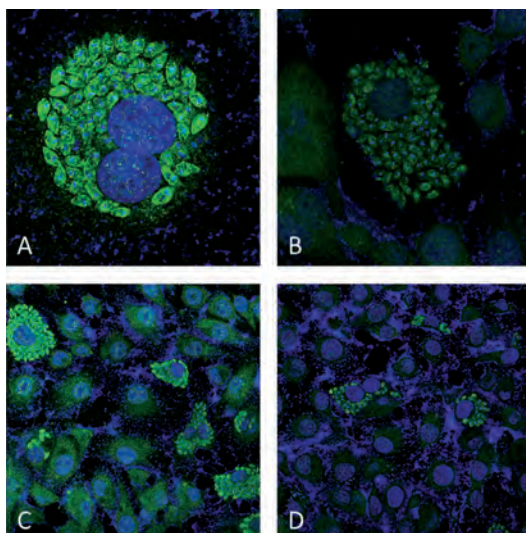


Figura 1. Amastigotes de *T. cruzi* “secuestran” el “pool” intracelular de galectinas. Células LLC-MK2 creciendo en cubreobjetos se infectaron con Tripomastigotes de *T. cruzi*. 4 días post-infección, las células se procesaron para inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos anti-galectina-1 (A y B) y anti-galectina-3 (C y D).

Figure 1. *T. cruzi* amastigotes take over soluble intracellular pool of galectins. LLC-MK2 cells growing onto glass coverslips were infected. After four days p.i., the cells were processed for immunofluorescence and stained with anti galectin 1 (A and B), galectin 3 (C and D).

Research summary

The laboratory's main purpose is to understand as the innate immune system recognizes pathogens through surface receptors - basically CLRs or C-type lectins and galectins-expressed mainly in macrophages and dendritic cells. In the past year we have developed a system of study that includes the full complement of glycan recognition proteins (human and murine) immobilized microarray format that will allow us to get a snapshot of how a particular pathogen is "seen" by the immune system. The results of studies using this predictive system may provide clues as to bias the immune response generated against a particular pathogen. A second objective is to define routes signaling / transduction induced in antigen presenting cells by the interaction of C-type lectins and galectins with their glycans. Knowing the nature of these pathways is essential for the identification of pathogen molecules that may act as regulators / immune modulators and hence serve as potential therapeutic targets for development of novel treatments.

Thirdly, is proposed to define the mechanisms by which the host c-type lectins are able to induce cellular activation programs leading to a decreased response to pro-inflammatory TLR ligands. In particular, consideration taken to decipher which combination of type C lectins / galectins-TLR is required for a specific immune response. Could ligands / glycans derived from pathogens, could be used as adjuvants Th1 or Th2? An approach that would answer this question, is to address the interaction of antigens previously demonstrated with some protective activity of *Leishmania* sp. towards skin dendritic cells through their fusion to CLRs ligands in order to stimulate a specific immune response.

Publicaciones / Publications

Aquillino, C., Gonzalez Rubio, M.L., Seco, E.M., Escudero, L., Corvo, L., Soto, M., Fresno, M., Malpartida, F., and Bonay, P. (2012) Different altrypanocidal activity of novel macrolide antibiotics; correlation to genetic lineage. *PLoS One* 7(7):e40901.

de la Fuente, H., Pérez-Gala, S., Bonay, P., Cruz-Adalia, A., Cibrian, D., Sánchez-Cuellar, S., Dauden, E., Fresno, M., García-Diez, A., and Sánchez-Madrid, F. (2012). Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. *J Pathol.* 228(2):193-203.

Carneiro, M.X., Santos, D.M., Fukutani, K.F., Clarencio, J., Miranda, J.C., Brodskyn, C., Barral, A., Barral-Netto, M., Soto, M. and de Oliveira, C.I. (2012) Vaccination with *L. infantum* nucleosomal histones confers protection against New World Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS One* 7(12), e52296.

Valadares, D.G., Duarte, M.C., Ramírez, L., Chávez-Fumagalli, M.A., Martins, V.T., Costa, L.E., Lage, P.S., Ribeiro, T.G., Castilho, R.O., Fernandes, A.P., Régis, W.C., Soto, M., Tavares, C.A. and Coelho, E.A. (2012) Prophylactic or therapeutic administration of *Agaricus blazei* murillii effective in treatment of murine visceral leishmaniasis. *Exp. Parasitol.*, 132, 228-236.

Valadares, D.G., Duarte, M.C.m Ramírez, L., Chávez-Fumagalli, M.A., Lage, P.S., Martins, V.T., Costa, L.E., Ribeiro, T.G., Régis, W.C., Soto, M., Fernandes, A.P., Tavares, C.A. and Coelho, E.A. (2012) Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 111, 1807-1816.

Abánades, D.R., Arruda, L.V., Arruda, E.S., Pinto, J.R.A.S., Palma, M.S., Aquino, D., Caldas, A.J., Soto, M., Barral, A. and Barral-Netto, M. (2012) Immunodominant antigens of *Leishmania chagasi* associated with protection against human visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(1), e1687.

Santos, D.M., Carneiro, M.W., de Moura, T.R., Fukutani, K., Clarencio, J., Soto, M., Espuelas, S., Brodskyn, C., Barral, A., Barral-Netto, M. and de Oliveira, C.I. (2012) Towards the development of novel immunization strategies against leishmaniasis using PLGA Nanoparticles loaded with Kinetoplastid Membrane Protein-11. *Int. J. Nanomedicine.* 7, 2115-2127.

Coelho, V.T.S., Oliveira, J.S., Valadares, D.G., Chaves-Fumagalli, M.A., Duarte, M.C., Lage, P.S., Soto, M., Santoro, M.M., Tavares, C.A.P., Fernandes, A.P. and Coelho, E.A.F. (2012) Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(1)e1430.

Oliveira, D.M., Costa, M.A., Chavez-Fumagalli, M.A., Valadares, D.G., Duarte, M.C., Costa, L.E., Martins, V.T., Gomes, R.F., Melo, M.N., Soto, M., Tavares, C.A. and Coelho, E.A. (2012) Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmaniachagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol. Res.* 110, 1277-1285.

Da Silva, R.A., Tavares, N.M., Costa, D., Pitombo, M., Barbosa, L., Fukutani, K., Miranda, J.C., de Oliveira, C.I., Valenzuela, J.G., Barral, A., Soto, M., Barral-Netto, M. and Brodskyn, C. (2011) DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *Acta Tropica.* 120, 185-190.

Carrión, J., Folgosa, C., Soto, M., Fresno, M. and Requena, J.M. (2011) *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. *Parasit. Vectors.* 4, 150.

Iborra, S., Soto, M., Stark-Aroeira, I., Castellano, E., Alarcón, B., Alonso, C., Santos, E. and Fernandez-Malave, E. (2011) Hras and Nras are dispensable for T-cell development and activation but critical for protective Th1 immunity in mice. *Blood.* 117, 5102-5111.

Guerra, N., Vega-Sendino, M., Pérez-Morgado, M.I., Ramos, E., Soto, M., González, V.M. and Martín, M.E. (2011) Identification and functional characterization of a poly(A)-binding protein from *Leishmania infantum* (LiPABP). *FEBS Letter* 585:193-198.

Iborra, S., Abanades, D.R., Bonay, P. and Soto, M. *Biología Molecular de Leishmania: Regulación de la Expresión Génica (Leishmania Molecular Biology: gene expression regulation)*. Chapter 3 In *Leishmaniasis e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas (Leishmaniasis and American tegumentary Leishmaniasis)*. Edited by CYTED and CNPq. 2011 ISBN: 978-85-60356-07-2.

Otras actividades / Other activities

Pedro Bonay Miarons ha sido nombrado representante español en la International Glycoconjugate Organization.

Patentes / Patents

Carlos Alonso, Manuel Soto, Laura Ramírez, Jerónimo Carnés, Marta Román. Molecule for treating an inflammatory disorder. Publication number: WO 2012/152792 A1 (15/11/2012). Laboratorios CBF LETI S.L. Unipersonal.

Carlos Alonso, Laura Ramírez, Manuel Soto. The use of an L3 and/or L5 source as a vaccine or as a diagnostic for a parasitic disease. Publication number: WO 2011/058137 A1 (15/05/2011). Laboratorios CBF LETI S.L. Unipersonal.

Manuel Soto, Laura Ramírez and Carlos Alonso. "Diagnosis of a parasitic disease such as leishmaniasis using ribosomal protein extracts (RPE)". Publication number: WO 2011/006891 A1 (20/01/2011). Laboratorios CBF LETI S.L. Unipersonal.

Interacciones funcionales entre la tetraspanina CD9 y moléculas de adhesión celular

Functional interactions between tetraspanin CD9 and cell adhesion molecules



Jefe de Línea / Group Leader:
Carlos Cabañas Gutiérrez

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Lorena Sánchez Martín

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Raquel Reyes Manzanar
Yessenia Machado Pineda

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Irene Tejada Sánchez

Estudiantes /
Undergraduate Students
Nouf Almalki
M^a Angeles Arribas Barrios

Resumen de investigación

La tetraspanina CD9 presenta una alta capacidad de interaccionar con otras proteínas de superficie en diversos tipos de células. A través de estas interacciones, CD9 es capaz de regular procesos celulares cruciales como la adhesión, migración, invasión y proliferación.

ADAM17/TACE es una proteasa responsable del corte y liberación ("shedding") de los ectodominios de numerosas proteínas de la superficie celular que están críticamente implicadas en desarrollo, crecimiento, adhesión, diferenciación y migración de leucocitos y células tumorales. ADAM17/TACE es importante en la regulación de la adhesión celular a través del shedding de moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1, NCAM, L1CAM y ALCAM) o de otras familias (CD44 y L-selectina).

ALCAM/CD166 es una glicoproteína de transmembrana de 110 kDa de la superfamilia de las inmunoglobulinas que media adhesión intercelular a través de interacciones homofílicas (ALCAM-ALCAM) y heterofílicas (ALCAM-CD6) y está implicada en el crecimiento invasivo y metástasis de diferentes tumores (melanomas, carcinomas de mama, próstata, ovario y colorectal). ALCAM puede ser cortada en su región extracelular yuxtamembranal por ADAM17/TACE, liberándose en una forma soluble de 96 kDa (sALCAM). Los niveles circulantes de sALCAM están elevados en pacientes con diferentes tipos de cáncer, lo que sugiere la implicación de esta molécula en la motilidad e invasión de las células tumorales.

Hemos demostrado que CD9 es capaz de regular la adhesión en células tumorales a través de un doble mecanismo. Por una parte esta tetraspanina induce agregación de diferentes moléculas de adhesión a través de interacciones específicas induciendo su reclutamiento en microdominios denominados TEMs (Tetraspanin-Enriched Microdomains) y cambios en la avidéz por sus ligandos. Además, CD9 regula negativamente la actividad proteolítica de ADAM17/TACE, modulando el balance entre las formas de transmembrana y soluble y alterando la actividad de diferentes moléculas implicadas en adhesión e inflamación, incluyendo TNF- α , ICAM-1 y ALCAM.

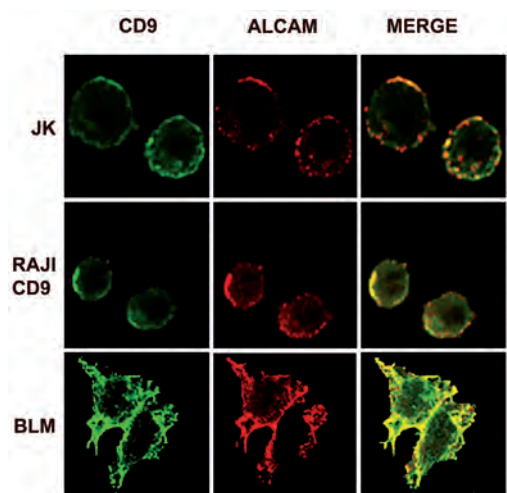


Figura 1. Análisis por microscopía confocal de la co-localización entre ALCAM/CD166 y la tetraspanina CD9 en las líneas celulares Jurkat (linfocitaria T), Raji-transfectadas con CD9 (linfocitaria B) y BLM (melanoma). Se observa una co-localización parcial de estas moléculas en la membrana plasmática de los tres tipos celulares. Las áreas de co-localización entre CD9 y ALCAM en células linfocíticas están distribuidas siguiendo un patrón "parcheado", mientras que en las células adherentes de melanoma BLM la co-localización está particularmente enriquecida en las regiones de contacto célula-célula.

Figure 1. Confocal microscopy analysis of the co-localization between the adhesion molecule ALCAM/CD166 and the tetraspanin CD9 in Jurkat T cells, CD9-transfected Raji B cells and BLM melanoma cells. Partial co-localization of these molecules is observed on the plasma membrane of the three cell types. Interestingly, the areas of co-localization between CD9 and ALCAM on lymphoid cells are distributed following a patched pattern while on the adherent BLM melanoma cells co-localization is particularly enriched in cell-cell contacts.

Research summary

The tetraspanin CD9 displays a high ability to interact with other surface proteins in several types of cells. Through these interactions, CD9 regulates key cellular processes such as adhesion, migration, invasion and proliferation.

ADAM17/TACE is protease responsible for ectodomain “shedding” of a large number of cell surface proteins that are critically involved in development, growth, adhesion, differentiation, and migration of leukocytes and tumor cells. ADAM-17/TACE is particularly important in the regulation of cell adhesion through the shedding of different adhesion molecules that either belong to the immunoglobulin superfamily (ICAM-1, VCAM-1, NCAM, L1CAM AND ALCAM) or to other families of adhesion receptors (CD44 and L-selectin).

ALCAM/CD166 is a transmembrane glycoprotein of 110 kDa with five Ig-type domains in its extracellular region, a single transmembrane region and a short intracytoplasmic tail. ALCAM mediates cell adhesion through homophilic (ALCAM-ALCAM) as well as heterophilic (ALCAM-CD6) interactions, and has been implicated in the invasive growth and metastasis of different types of tumors (melanomas and breast, prostate, ovary and colorectal carcinomas). ALCAM can be cleaved at its juxtamembrane extracellular region by ADAM-17/TACE, causing the release of a 96 kDa soluble form (sALCAM). The circulating levels of sALCAM are elevated in patients of different types of cancers, which suggests the implication of this molecule in the motility and invasion of malignant cells.

Our recent results have demonstrated that CD9 is capable to regulate the adhesion of tumoral cells through a dual mechanism. On the one hand, this tetraspanin induces the aggregation of different adhesion molecules through specific interactions inducing their recruitment into cell surface microdomains termed TEMs (Tetraspanin-Enriched Microdomains), which in turn induces changes in the avidity of these molecules for their ligands. Additionally, CD9 negatively regulates the proteolytic activity of ADAM-17/TACE and through this effect is able to control the balance between the transmembrane and soluble forms (and hence the activity) of different proteins involved in cell adhesion and inflammation, including TNF- α , ICAM-1 and ALCAM.

Publicaciones / Publications

Gutiérrez-López, M.D., Gilsanz, A., Yáñez-Mó, M., Ovalle, S., Lafuente, M.E., Domínguez, C., Monk, P.N., González-Alvaro, I., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C. (2011). The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**:3275-3292.

Yáñez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F. and Cabañas C. (2011). Membrane proteases and tetraspanins. *Biochemical Society Transactions* **39**:541-546.

Hernández-Varas, P., Coló, G.P., Bartolomé, R.A., Paterson, A., Medraño-Fernández, I., Cabañas, C., Sánchez-Mateos, P., Lafuente, E.M., Boussiotis, V.A., Strömblad, S. and Teixidó, J. (2011). Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) protein controls invasion and growth of melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **286**:18492-18504.

Yáñez-Mó, M., Gutiérrez-López, M.D., and Cabañas, C. (2011). Functional interplay between tetraspanins and proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**:3323-35.

Rossi, E., Langa, C., Gilsanz, A., Blanco, F.J., Ayllón, J., Villar, E., Botella, L.M., Cabañas, C., Shaw, M., and Bernabeu, C. (2012). Characterization of chicken endoglin, a member of the zona pellucida family of proteins, and its tissue expression. *Gene* **491**:31-9.

Sánchez-Martín, L., Sánchez-Mateos, P., and Cabañas, C. (2012). CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends in Molecular Medicine*. doi: 10.1016/j.molmed.2012.10.004. Epub 2012 Nov 12.

Gilsanz, A., Sánchez-Martín, L., Gutiérrez-López, M.D., Ovalle, S., Machado-Pineda, Y., Reyes, R., Swart, G.W., Figdor, C.G., Lafuente, E.M., and Cabañas, C. (2012). ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. *Cellular and Molecular Life Sciences* doi: 10.1007/s00018-012-1132-0. Epub 2012 Sep 30.

Rossi, E., Sanz-Rodríguez, F., Eleno, N., Düwell, A., Blanco, F.J., Langa, C., Botella, L.M., Cabañas, C., López-Novoa, J.M., and Bernabeu, C. (2012). Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* doi: 10.1182/blood-2012-06-435347. Epub 2012 Oct 16.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Iria Medraño Fernández (2012). Papel de la proteína adaptadora RIAM en la fagocitosis mediada por complemento. Universidad Complutense de Madrid. Directores: Dra. M^a Esther Lafuente y Dr. Carlos Cabañas.

Álvaro Gilsanz Cáceres (2012). La tetraspanina CD9 regula la función de la metaloproteasa ADAM17/TACE y de su sustrato ALCAM. Universidad Complutense de Madrid. Director: Dr. Carlos Cabañas.

Interacción entre el citoesqueleto y la membrana plasmática

Cytoskeleton-plasma membrane interactions



Jefe de Línea / Group Leader:
Isabel Correas Hornero

Personal Científico / Scientific Staff:
Jaime Millán Martínez
Carlos M. Luque

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Ana Ruiz Sáenz (desde Diciembre 2012)

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Ana Ruiz Sáenz (hasta Noviembre 2012)
Natalia Reglero Real
Beatriz Marcos Ramiro
Laura Rangel Sánchez (desde Septiembre 2012)
Diana Santander García (desde Junio 2012)
Diego García Weber (desde Diciembre 2012)

Estudiantes / Undergraduate Students
Gema Fernández Estradé
Carmen Guerrero Galán
Alvaro Sainz Vacas

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:
Laura Fernández Martín
Víctor Serrano García de Cortazar

Resumen de investigación

El control de la morfología celular y organización tisular se lleva a cabo a través de múltiples interacciones de proteínas y lípidos de la membrana plasmática con el citoesqueleto subyacente. Esta coordinación membrana-citoesqueleto es esencial para múltiples procesos celulares como la migración, la adquisición de polaridad, el mantenimiento de las barreras epiteliales y endoteliales, o la división o el transporte vesicular e intracelular.

Los intereses de nuestro grupo en los últimos años se centran en caracterizar la organización de la membrana plasmática y/o el citoesqueleto en diferentes procesos celulares, con un interés particular en el estudio de la función en la migración celular y en el mantenimiento de la barrera endotelial de las proteínas de la superfamilia 4.1, las cuales conectan el citoesqueleto subcortical y la membrana plasmática, a través de sus dominios FERM (four-point-one, ezrin-radixin-moesin).

Durante el periodo 2011-2012 hemos determinado que la proteína 4.1R es clave para la migración y la polaridad celular a través del reclutamiento de la proteína IQGAP1 en el lamelipodio. Además, la proteína 4.1R también controla la dinámica de los microtúbulos y de las plataformas corticales, que constituyen dominios de anclaje de esta red citoesquelética a la membrana plasmática en contacto con la matriz extracelular. Estos datos indican que 4.1R actúa como proteína de andamiaje en el lamelipodio celular. Hemos iniciado estudios paralelos en *Drosophila melanogaster* con el fin de comprender la función de Coracle/4.1.

Un ejemplo paradigmático de la importancia que tiene la interacción membrana-citoesqueleto es el mantenimiento de la barrera endotelial y su alteración durante la inflamación. En este periodo hemos caracterizado una nueva organización de los complejos de unión célula-célula tipo adherens que mantienen la integridad de las monocapas endoteliales y cuya dispersión en respuesta a estímulos inflamatorios como el TNF- α , contribuyen al aumento de la permeabilidad endotelial. Hemos demostrado además que la disfunción de la barrera en respuesta a esta citoquina requiere la activación en los bordes celulares de las proteínas de la familia 4.1 ezrina, radixina y moesina.

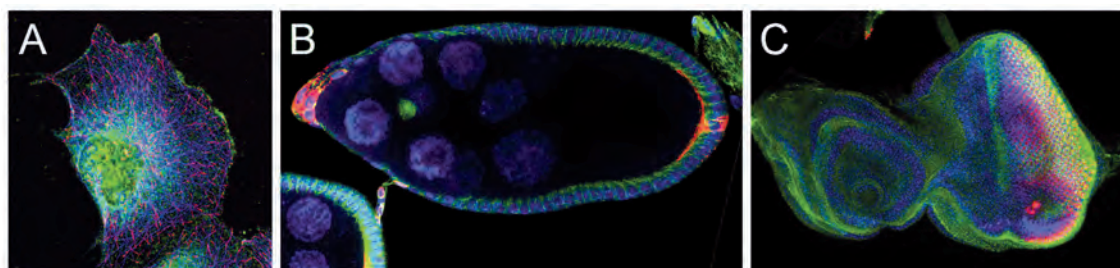


Figura 1. La proteína 4.1R conecta la membrana plasmática y el citoesqueleto celular. A) Células ECV304 teñidas para 4.1R (verde), la proteína de unión al extremo 'más' de los microtúbulos, EB1, (rojo) y α tubulina (azul). B) Folículo ovárico de *Drosophila melanogaster* en estadio 9 de maduración teñido para 4.1/Coracle (verde), GFP dirigida a membrana plasmática (rojo) y DAPI (azul). C) Disco imaginal de ojo-antena de *D. melanogaster* en el tercer estadio larvario, teñido para 4.1/Coracle (verde), el marcador neuronal ELAV (rojo) y DAPI (azul).

Figure 1. Protein 4.1R at the plasma membrane – cytoskeleton interface. A) ECV304 cells stained for 4.1R (green), microtubule plus-end protein EB1 (red) and α tubulin (blue). B) Stage 9 egg chamber from *Drosophila melanogaster*, stained for 4.1/Coracle (green), membrane targeted GFP (red) and DAPI (blue). C) Eye-antennal imaginal disc from *D. melanogaster* third instar larva, stained for 4.1/Coracle (green), neural marker ELAV (red) and DAPI (blue).

Research summary

Cell morphology and tissue organization are maintained through multiple interactions between lipids and proteins from the plasma membrane and the underlying cytoskeleton. The coordination between surface membranes and different cytoskeletal networks is essential for processes such as cell migration, polarity, epithelial and endothelial barrier stability, cell division or intracellular vesicular transport.

In recent years we have been interested in investigating the role of proteins that regulate plasma membrane and/or cytoskeletal organization in different cellular events. We have been studying the role in cell migration of the 4.1 family of proteins, which connect subcortical cytoskeleton to lipids and membranes through FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin) domains.

During the period 2011-2012 we have found that the protein 4.1R regulates cell migration and polarity by recruiting IQGAP1 to cell lamellipodia. In addition, 4.1R also controls the dynamics of microtubules and cortical platforms, membrane domains that connect microtubules to the plasma membrane in contact with the extracellular matrix. Collectively, our work unveils an essential role for 4.1R as a scaffolding protein at the cell leading edge. In parallel studies we have started the functional characterization of Coracle, the only protein 4.1 ortholog in *Drosophila melanogaster*.

A paradigmatic example of the importance of the membrane-cytoskeleton crosstalk is the maintenance of endothelial barrier integrity and its disruption in response to inflammation. In these two years we have characterized an unique organization of endothelial Adherens Junctions, called reticular, which controls the endothelial barrier and mediates the increase in permeability induced by the proinflammatory cytokine TNF- α . It is of note that this permeability alteration is caused by activation of the 4.1 family members Ezrin, Radixin and Moesin at cell-cell borders.

Publicaciones / Publications

Ruiz-Saenz, A., Kremer, L., Alonso, M.A., Millan, J., and Correas, I. (2011). Protein 4.1R regulates cell migration and IQGAP1 recruitment to the leading edge. *J. Cell Sci.* **124**, 2529-2538.

Aranda, J.F., Reglero-Real, N., Kremer, L., Marcos-Ramiro, B., Ruiz-Saenz, A., Calvo, M., Enrich, C., Correas, I., Millan, J.*, and Alonso, M.A.* (2011). MYADM regulates Rac1 targeting to ordered membranes required for cell spreading and migration. *Mol. Biol. Cell* **22**, 1252-1262.

Fernandez-Martin, L., Marcos-Ramiro, B., Bigarella, C.L., Graupera, M., Cain, R.J., Reglero-Real, N., Jimenez, A., Cernuda-Morollon, E., Correas, I., Cox, S., Ridley, A.J., and Millan, J. (2012). Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, e90-e102.

Andres-Delgado, L., Anton, O.M., Bartolini, F., Ruiz-Saenz, A., Correas, I., Gundersen, G.G., and Alonso, M.A. (2012). INF2 promotes the formation of deetyrosinated microtubules necessary for centrosome reorientation in T cells. *J. Cell Biol.* **198**, 1025-1037.

Reglero-Real, N., Marcos-Ramiro, B., and Millan, J. (2012). Endothelial membrane reorganization during leukocyte extravasation. *Cell Mol. Life Sci.* **69**, 3079-3099

Tesis doctorales / Doctoral theses

Ana Ruiz Sáenz (2011). La proteína 4.1R regula la organización del citoesqueleto de tubulina y la migración celular. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Isabel Correas.

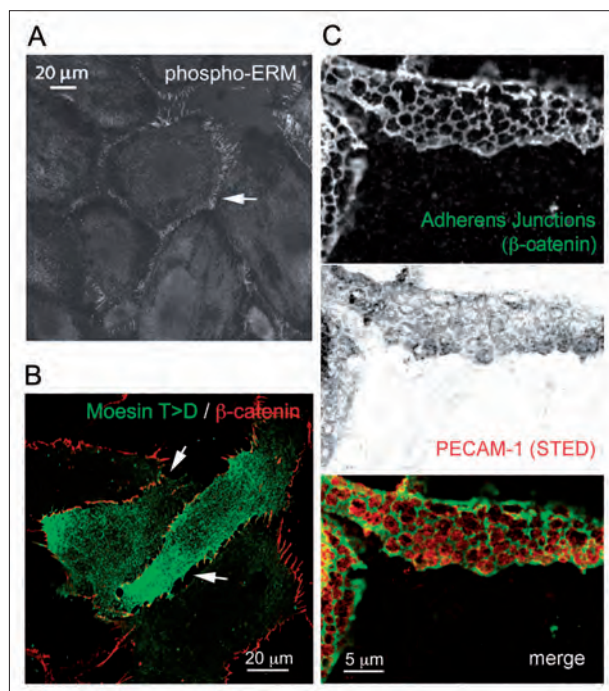


Figura 2. (A, B) Las proteínas ERM regulan la estabilidad de las uniones célula-célula. (A) Las proteínas ERM activas, fosforiladas, están enriquecidas en los contactos célula-célula de las células endoteliales humanas (flecha). **(B)** La expresión de un mutante constitutivamente activo de moesina (Moesin T>D) es suficiente para inducir la apertura de huecos entre células (flechas). β -catenin es un marcador de las uniones célula-célula. **(C) Uniones reticulares en células humanas endoteliales.** Estructuras reticulares en sitios solapantes de unión célula-célula regulan la permeabilidad endotelial y se dispersan en respuesta a TNF- α . Las uniones adherentes reticulares (β -catenin) están entremezcladas con estructuras tubulares de PECAM-1, como se observa mediante microscopía confocal de superresolución (STED).

Figure 2. (A, B) ERM proteins regulate cell-cell junction stability. (A) Active phosphorylated ERM proteins are enriched in cell-cell contacts in endothelial cells (arrow). **(B)** Overexpression of a constitutively active mutant moesin (Moesin T>D) induces gap opening at cell-cell junctions (arrows). (More in Aranda et al. *MBoC* 2012). **(C) Reticular junctions in human endothelial cells.** Reticular structures at cell-cell overlapping contacts regulate endothelial cell permeability and are dispersed in response to TNF- α . Reticular Adherens Junctions (β -catenin) are interspersed in PECAM-1 tubular structures, as revealed by super resolution confocal microscopy (STED). (More in Fernandez-Martin et al. *ATVB*. 2012).

Inmunología Viral

Viral Immunology



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Margarita del Val Latorre

Personal Científico de Plantilla /
Scientific Staff:
Luis Antón Canto

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
David Molina Arana
Alicia Palacios Ortega
Beatriz Gozalbo

Becarios / *Contratados Predoctorales /*
Graduate Students:
Silvia Lázaro García
Lorena López Ferreras

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Susana Sánchez Lara

Estudiantes /
Undergraduate Students:
David Gamarra Carrasco
Dieke van Dinther

Científicos visitantes /
Visiting Scientists:
Salvador Iborra Martín
Pedro Aparicio Alonso

Resumen de investigación

Nuestro objetivo es el estudio de los mecanismos que subyacen a la respuesta inmune celular frente a infecciones virales, para contribuir al diseño racional de vacunas. Las infecciones muy citopáticas pueden ser controladas por vacunas basadas en anticuerpos. Sin embargo, se necesitan nuevas estrategias vacunales para combatir las infecciones crónicas y menos citopáticas, que deben estar basadas en la inducción de una respuesta inmune celular de linfocitos T potente y duradera.

Estudiamos los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos virales por MHC de clase I, tanto en células infectadas por virus, que permiten su eliminación por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, como en células dendríticas, que permiten la activación de dichos linfocitos. Analizamos nuevas proteasas que procesen antígenos virales, entre ellas las caspasas. También estudiamos nuevas rutas de procesamiento antigénico que transcurren en la vía secretoria, así como vías que son independientes de los transportadores TAP. Los ensayos en modelos animales de infección *in vivo* revelan la relevancia cuantitativa de estas nuevas vías, y podrían explicar el eficaz control de la mayoría de las infecciones por personas deficientes en TAP.

Por último, estudiamos modelos animales de infección. Analizamos el papel del factor de transcripción NFAT5 en la respuesta innata eficaz frente a *Leishmania*, así como la inducción de una respuesta inmune antiviral de linfocitos T CD8⁺ de memoria protectores, eficaces y duraderos.

Mantenemos colaboraciones con Margarita García-Calvo (Merck, EEUU), Cristina López-Rodríguez (Universidad Pompeu Fabra, Barcelona), Manuel Leal (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla), José Esté (IRSI-Caixa, Badalona, Barcelona), Manuel Ramos, Carolina Johnstone, José Antonio Melero y Daniel López (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid), Edgar Fernández-Malavé (Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid), José Yélamos (Instituto Municipal de Investigaciones Médicas y Hospital del Mar, Barcelona) y Pedro Aparicio (Facultad de Medicina, Universidad de Murcia).

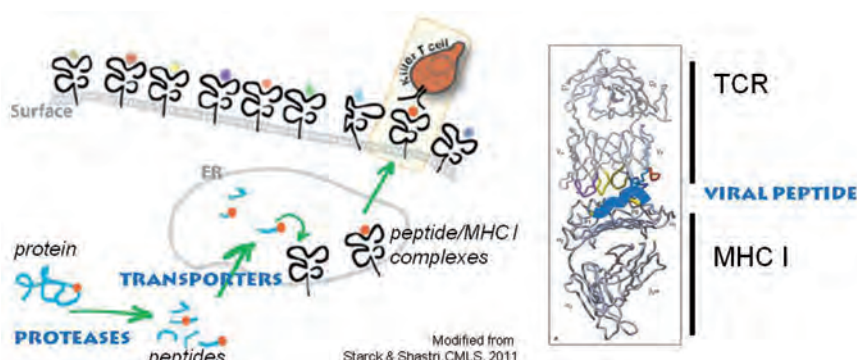


Figura 1. Mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos virales a linfocitos T citotóxicos CD8⁺.

Figure 1. Understanding the mechanisms of viral antigen processing and presentation to CD8⁺ T lymphocytes.

Research summary

Our interest is to study the mechanisms underlying the cellular immune response to viral infections, in order to gain knowledge useful for rationale vaccine development. For many strongly cytopathic infections, vaccines eliciting strong neutralizing antibody responses are the choice. However, there is a strong need for new stimulating strategies for vaccine design to fight chronic and less cytopathic infections, requiring long-lasting and potent T-lymphocyte-mediated immune responses.

We study the mechanisms of antigen processing and presentation by MHC class I molecules in virus-infected cells, which allow their elimination by CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes, and in dendritic cells, which prime these lymphocytes. We study novel proteases that can process viral antigens, such as caspases. In addition, we study novel routes of antigen presentation to CD8⁺ T lymphocytes, particularly those that are independent of TAP transporters, and those that take place in the secretory pathway. We research into the quantitative physiological relevance of the novel viral antigen processing pathways *in vivo*, which may help explain why TAP-deficient humans control most pathogen infections.

Finally, we work with animal models of infection. We study the role of transcription factor NFAT5 in the efficient control of *Leishmania* infection by the innate immune system. We also research into factors that contribute to an efficient, protective and long-lasting antiviral CD8⁺ T lymphocyte memory response.

We have on-going collaborations with Margarita García-Calvo (Merck, USA), Cristina López-Rodríguez (Universidad Pompeu Fabra, Barcelona), Manuel Leal (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla), José Esté (IRSI-Caixa, Universidad Autónoma de Barcelona, Badalona), Manuel Ramos, Carolina Johnstone, José Antonio Melero and Daniel López (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid), Edgar Fernández-Malave (Faculty of Medicine, Universidad Complutense de Madrid), José Yélamos (Instituto Municipal de Investigaciones Médicas and Hospital del Mar, Barcelona) and Pedro Aparicio (Faculty of Medicine, Universidad de Murcia).

Publicaciones / Publications

Infantes, S., Lorente, E., Cragolini, J.J., Ramos, M. García, R., Jiménez, M., Iborra, S., Del Val, M., and López, D. (2011). Unusual viral ligand with alternative interactions is presented by HLA-Cw4 in human respiratory syncytial virus-infected cells. *Immunol. Cell Biol.*, **89**, 558-565.

Ruiz-Mateos, E., Machmach, K., Romero-Sánchez, M. C., Ferrando-Martínez, S., Vicianá, P., Del Val, M., Muñoz-Fernández, M. A., Genebat, M., Leal, M. and Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS). (2011). Hepatitis C virus replication in Caucasian HIV-controllers. *J. Viral Hepatitis*, **18**, e350-e357.

Del Val, M., Iborra, S., Ramos M. and Lázaro, S. (2011). Generation of MHC class I ligands in the secretory and vesicular pathways. *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 1543-1552.

López, D., Jiménez, M., García-Calvo, M. and Del Val, M. (2011). Concerted antigen processing of a short viral antigen by human caspases 5 and 10. *J. Biol. Chem.*, **286**, 16910-16913.

Buxadé, M., Lunazzi, G., Minguillón, J., Iborra, S., Berga-Bolaños, R., Del Val, M., Aramburu J. and López-Rodríguez, C. (2012). Gene expression induced by Toll-like receptors in macrophages requires the transcription factor NFAT5. *J. Exp. Med.*, **209**, 379-393.

Ballana, E., Ruiz-de Andrés, A., Mothe, B., Ramírez de Arellano, E., Aguilar, F., Badia, R., Grau, E., Clotet, B., Del Val, M., Brander, C. and Esté, J. A. (2012). Differential prevalence of the HLA-C -35 CC genotype among viremic long term non-progressor and elite controller HIV⁺ individuals. *Immunobiol.*, **217**, 889-894.

Johnstone, C., Ramos, M., García Barreno, B., López, D., Melero J. A. and Del Val, M. (2012). Exogenous, TAP independent lysosomal presentation of a respiratory syncytial virus CTL epitope. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 978-982.

Benítez-Ribas, D., Borràs, F. E., Del Val, M., Lasarte, J. J., Marañón, C., Martín-Gayo, E., Sarobe, P., Toribio, M. L. and Montoya, M. (2012). Dendritic cells: nearly 40 years later.... *Inmunología*, **31**, 49-57.

Otras actividades / Other activities

Margarita del Val:

- Secretaria de la Sociedad Española de Inmunología.

- Asesora adjunta de la Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva, Ministerio de Economía y Competitividad.

- Miembro del Comité Científico-Técnico del Biobanco Español de HIV.

Tesis doctorales / Doctoral theses

David Gamarra Carrasco (2012). Máster en Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Margarita del Val Latorre.

Dieke van Dinther (2012). Master on Immunity and Infection. Graduate School of Life Sciences. Universidad de Utrecht, Holanda. Co-Directores: Margarita del Val Latorre y Emmanuel Wiertz.

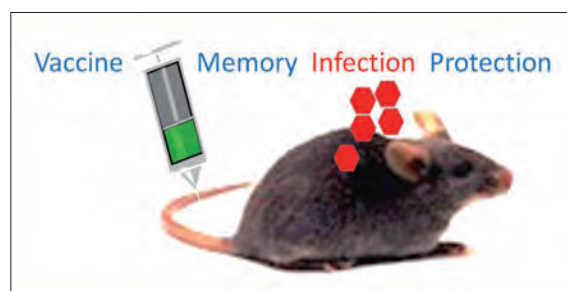


Figura 2. Linfocitos T CD8⁺ antivirales y desarrollo de vacunas.

Figure 2. Antiviral CD8⁺ T lymphocytes and vaccine design.

Susceptibilidad Genética en Enfermedades complejas: genes implicados en el desarrollo de linfomas linfoblásticos T

Genetic susceptibility in complex diseases: genes involved in T-cell lymphoblastic lymphoma development



Jefe de Línea / Group Leader:
José Fernández-Piqueras

Personal Científico / Scientific Staff:
Javier Santos Hernández
María Villa Morales

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Laura González Sánchez
Elena González Gugel
Pilar López Nieva
María de los Ángeles Cobos Fernández

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Ana María Roncero Sánchez
Manuel Malavé Galiana

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:

María del Carmen de Arriba Pérez

Estudiantes / Undergraduate Students:

Bárbara Briega

Celia Santos

José Luis Marín Rubio

Alvaro Peiró

Científicos Visitantes / Visiting Scientists:

Janet Morfi (Universidad de la Habana, Cuba)

Resumen de investigación

Nuestro equipo ha trabajado durante los últimos dos años en linfomas linfoblásticos T murinos (T-LBL) que surgen espontáneamente en algunos tipos de ratones KO, o que son inducidos mediante radiación gamma en cepas consanguíneas, así como en líneas consómicas y congénicas derivadas. Los resultados obtenidos se confirmaron en muestras representativas de linfomas primarios humanos equivalentes. La aplicación de diferentes aproximaciones genómicas (*cDNA-expression* y *CGH-arrays*) y análisis epigenéticos nos han permitido identificar múltiples genes codificantes y no-codificantes (miRNAs) implicados en la susceptibilidad al desarrollo de este tipo de linfomas. Entre nuestros principales logros caben destacar: la demostración de que la sobre-expresión del oncogen c-Myc está controlada por el efecto combinatorio de múltiples miRNAs, la identificación de un nuevo gen causal en la delección 6q de los linfomas humanos, la identificación de mutaciones clave implicadas en la disfunción de la vía apoptótica Fas/FasL, y la identificación de varios genes y polimorfismos génicos implicados en la susceptibilidad al desarrollo de varias enfermedades complejas o en la resistencia a drogas.

Nuestros objetivos actuales se centran en: (1) demostrar el potencial oncogénico de la sobre-expresión de los alelos salvajes de oncogenes críticos que presentan tasas de mutación muy bajas en los tumores, mediante estrategias de transferencia adoptiva con células troncales hematopoyéticas modificadas genéticamente; (2) identificar las principales alteraciones genéticas y epigenéticas que caracterizan cada etapa del desarrollo tumoral; (3) analizar las causas y efectos de la des-regulación de la vía Fas/FasL en el desarrollo de los T-LBL humanos; (4) explotar el daño colateral ocasionado por las delecciones más comunes para eliminar específicamente las células tumorales; y (5) integrar los resultados derivados de las diferentes aproximaciones genómicas en un mapa de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permita introducir mejoras en el pronóstico y diagnóstico de este tipo de linfomas, y el desarrollo de nuevas y más eficaces estrategias terapéuticas.

Figura 1. Relación entre genes sobre-expresados y miRNAs con expresión reducida en linfomas T inducidos con radiación gamma. GIs se refiere al número de estos miRNAs que pueden controlar potencialmente un mismo gen codificante. El oncogen c-Myc podría estar controlado por 41 miRNAs.

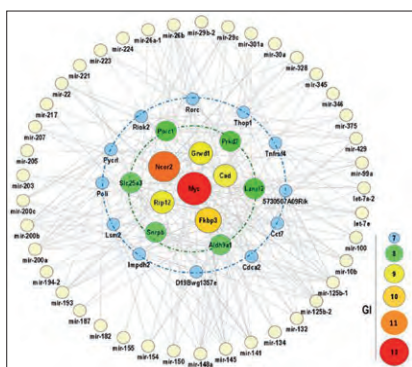


Figure 1. Relationship between overexpressed genes and down-regulated miRNA genes in gamma-irradiation-induced T-cell lymphomas. GIs are defined as the number of down-regulated miRNA genes that can potentially target specific overexpressed genes. Thirteen of the 41 miRNA genes down-regulated in these tumours can potentially target the *Myc* 3'-UTR.

Figura 2. Análisis de metilación de islas CpG en el promotor del gen EPHA7 en una muestra representativa de linfomas linfoblásticos T humanos (T-LBLs). MSP y secuenciación después de bisulfito.

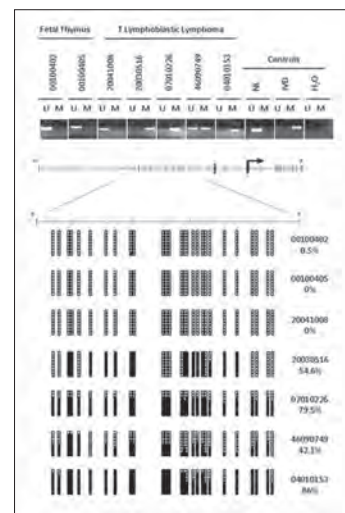


Figure 2. Methylation analysis of CpG-islands in the promoter region of *EPHA7* gene in human T-LBL samples. MSP and Bisulphite-sequencing.

Research summary

In the last two years we have been working on murine T-cell lymphoblastic lymphomas (T-LBLs) arising spontaneously in knockout mice and, in particular, with T-LBLs induced by gamma-irradiation in inbred strains, as well as in consomics and congenic derived strains. Results obtained in mouse were confirmed in human cell lines derived from this type of lymphomas and in primary T-LBLs. Genome wide analyses using cDNA-expression arrays, CGH-arrays and epigenetic approaches, allowed us to identify multiple coding and non-coding (miRNAs) loci underlying genetic susceptibility in these lymphomas. Our major achievements include the demonstration of combinatorial effects of microRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway, the identification of a new target gene for 6q deletion in human T-LBLs, the identification of key mutations that disturb the Fas/FasL apoptotic pathway, and the identification of multiple genes and gene-polymorphisms involved in major complex diseases or in drug resistance. Present and future initiatives of our group are (1) to assess the oncogenic potential of over-expression of critical oncogenes exhibiting very low rates of mutation using adoptive transfer approaches with different types of genetically-modified hematopoietic-stem cells, (2) to identify the genetic and epigenetic changes associated with the different stages of T-LBL development (3) to unravel how the deregulation of Fas apoptotic signalling is contributing to T-LBL development (4) to exploit the collateral damage of common deletions to kill lymphoma cells, and (5) to integrate the results of all genomic approaches into a map of genetic and epigenetic alterations for human T-LBLs in order to improve prognosis and diagnosis, and to design more effective therapies.

Publicaciones / Publications

Bueno, M.J., Gómez de Cedrón, M., Pérez de Castro, I., Gómez-López, G., Di Lisio, L., Montes Moreno, S., Martínez, N., Guerrero, M., Sánchez-Martínez, R., Santos, J., Pisano, D.G., Piris, M.S.A., Fernández-Piqueras J. and Malumbres, M. (2011) Combinatorial effects of microRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway. *Blood* **117**: 6255-6266.

Almoguera, B., Riveiro-Alvarez, R., Lopez-Castroman, J., Dorado, P., López-Rodríguez, R., Fernandez-Navarro, P., Baca-García, E., Fernandez-Piqueras, J., Dal-Ré, R., Abad-Santos, F., Llerena, A., Ayuso C., and The Spanish Consortium of Pharmacogenetics Research in Schizophrenia (2011) ATA homozygosity in the IL-10 gene promoter is a risk factor of schizophrenia in Spanish females. *BMC Medical Genetics* **12**:81.

López-Nieva, P., Vaquero, C., Fernández-Navarro, P., González-Sánchez, L., Villa-Morales, M., Santos, J., Esteller, M., and Fernández-Piqueras J. (2012) *EPHA7*, a new target gene for 6q deletion in T-cell lymphoblastic lymphomas. *Carcinogenesis* **33**: 452-458.

Villa-Morales, M. and Fernández-Piqueras, J. (2012) Targeting the FAS/FASL signalling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **16**:85-101.

Almoguera, B., Riveiro-Alvarez, R., Lopez-Castroman, J., Dorado, P., Vaquero-Lorenzo, C., Fernandez-Piqueras, J., Llerena, A., Abad-Santos, F., Baca-García, E., Dal-Ré, R., Ayuso C., & Spanish Consortium of Pharmacogenetics Research in Schizophrenia. (2012) Association of common genetic variants with risperidone adverse events in a Spanish schizophrenic population. *Pharmacogenomics J* doi: 10.1038/tpj.2011.57. [Epub ahead of print]. PMID: 22212732.

Fernández-Navarro P, Vaquero-Lorenzo C, Blasco-Fontecilla H, Díaz-Hernández M, Gratacòs M, Estivill X, Costas J, Carracedo A, Fernández-Piqueras J, Saiz-Ruiz J, Baca-García E. (2012). Genetic epistasis in female suicide attempters. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **38**: 294-301.

Otras actividades / Other activities

Organizador del III y IV Curso de Formación del Profesorado: El Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Conserjería de Educación de la CAM/CBMSO-UAM. (Del 4 al 8 de Julio de 2011 y del Del 2 al 5 de Julio de 2012). Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. C/ Nicolás Cabrera, 1. Campus de Cantoblanco. Universidad Autónoma de Madrid. 28049-Madrid.

Co-coordinador del Master en Genética y Biología Celular. Asignatura: Genética y Biología Celular del Cáncer. Cursos 2010-2011 y 2011-12. Universidad Autónoma de Madrid.

Miembro del Subcomité de Bioética del CSIC.

Miembro del Comité de Ética de la Investigación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa y Centro Nacional de Biotecnología (CEI-CBMSO-CNB).

Presidente del Comité de Ética de la Experimentación Animal del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CEEA-CBMSO).

Coordinador del Área de Biomedicina de la ANEP.

Patentes / Patents

José Fernández Piqueras, Javier Santos, Laura González, María VÍlla, Pablo Fernández-Navarro y Manuel Fresno. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T. Número de publicación: ES 2346280. Fecha de concesión: 02.09.2011.

José Fernández Piqueras, Javier Santos, Laura González, María VÍlla, Pablo Fernández-Navarro y Manuel Fresno. Prostaglandina E2 para la prevención o el tratamiento de linfomas linfoblásticos. Número de publicación: ES 2352773. Fecha de concesión: 23.01.2012.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Elena Gonzalez Gugel (2011). Activación constitutiva de la vía de señalización Hedgehog en linfomas linfoblásticos T por la sobre-expresión del gen *Smoothed*. Directores: José Fernández Piqueras y María Villa Morales.

Mediadores proinflamatorios y su implicación en enfermedades de etiología inflamatoria e inmune

Proinflammatory mediators and their involvement in immune and inflammatory-mediated diseases



Jefe de Línea / Group Leader:
Manuel Fresno Escudero

Personal Científico / Scientific Staff:
Nuria Gironés Pujol
Beatriz Cubelos Álvarez

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Natalia Cuesta Rubio
Ruth Álvarez Díaz
Carmen M^a Sánchez-Valdepeñas
Julien Santi-Rocca
Konstantinos Stamatakis

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Sofía Carbajosa González
Néstor Adrián Guerrero Gutiérrez
Alberto Jiménez Buiza
Marta Jiménez Martínez
Alba Jiménez Segovia
Maria Gema Marin Alberca
Inés Claire Osma García

Jossela Calderón
Vinatha Sreeramkumar

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:
Beatriz Barrocal López
Carlos Chillón Marinas
M^a Ángeles de Chorro y de Villa-Ceballos
Ana Flores Robles
M^a Carmen Maza Moreno

Estudiantes / Undergraduate Students:
Lucía Barrado
Javier Galán
Pablo Guasp
Andrés Lamsfus

Científicos Visitantes / Visiting Scientists:
Beatriz Tamargo
(Convenio de Colaboración Internacional UAM-U La Habana. Mayo-Junio, 2011)
Héctor Rodríguez
AECl. Octubre, 2011-Octubre, 2012.

Resumen de investigación

Existen similitudes entre el reconocimiento de patógenos por los TLR, la respuesta inmune a la infección y la inflamación crónica. Estamos analizando la ruta TLR/NIK/c-rel-NFAT/Cox-2/prostaglandinas (PGs) en nuevas funciones del sistema inmune y en enfermedades inflamatorias como Aterosclerosis, Obesidad, Cáncer y Enfermedad de injerto contra huésped. Hemos empezado a descifrar las conexiones entre TLRs y la activación de c-rel y NFAT. Estos dos factores de transcripción regulan mediadores inflamatorios como Cox-2 aumentando las respuestas inflamatorias. Además, PGE2 inducen la migración y función de macrófagos y linfocitos T incluyendo la duración de la interacción entre células dendríticas y linfocitos T en los ganglios linfáticos. TLR2-TLR4/NFATc2-NFATc4 controlan diferencialmente la expresión de genes adipogénicos y reprimen los anti-adipogénicos, en adipocitos promoviendo o evitando la obesidad. Además hemos identificado moléculas inducidas por Cox-2 como PMEPA1 y DUSP10 que controlan diferenciación y respuesta a estrés, respectivamente, claves en las propiedades tumorigénicas de carcinoma de colon y ovario.

Existen diferentes linajes genéticos de *Trypanosoma cruzi*, causante de la Enfermedad de Chagas, pero no se conoce su biología comparada ni tampoco su potencial patogenicidad. Hemos definido el papel del NO y de la Arginasa I producidas por las células mieloides supresoras (MDSC), así como otros mecanismos inmunopatogénicos. El balance Th1/Th17/Treg/MDSC determina la resistencia/ susceptibilidad, dependiendo de la genética del hospedador y del parásito. En general, Th1 son protectoras pero necesitan ser compensadas por Tregs para evitar demasiada inflamación. El efecto de Th17 depende factores genéticos del hospedador y el parásito. Las MDSC Arginasa I+ son perjudiciales y su bloqueo mejora la enfermedad. También estudiamos cómo el parásito entra, infecta, escapa a la destrucción y se replica en células mieloides demostrando que SLAMF1 es un nuevo receptor de *T. cruzi*. Todo ello con el objetivo final de comprender mejor y prevenir la Enfermedad de Chagas.

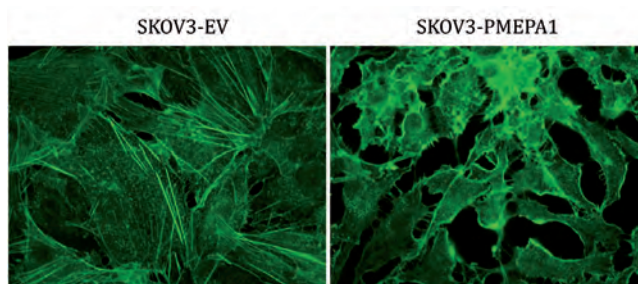


Figura 1. La sobreexpresión de PMEPA1, diana de Cox-2, parece controlar la transición epitelio mesenquimal de las células de carcinoma de ovario células Skov3. Células teñidas con faloidina fluorescente para visualizar los microfilamentos de actina.

Figure 1. PMEPA1, a downstream target of Cox-2 may control epithelial mesenchymal transition of ovarian carcinoma cells Skov3. Cells stained with phalloidin to visualize actin filaments.

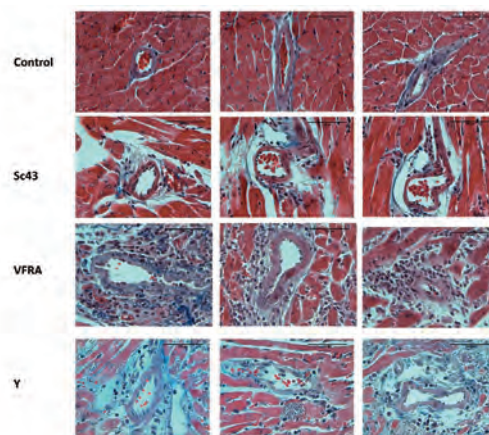


Figura 2. Diferentes tipos de miocarditis inducidos por 3 cepas diferentes de *T. cruzi*.

Figure 2. Different types of myocarditis induced by three different *T. cruzi* strains.

Research summary

There are similarities between recognition of pathogens by TLR, the immune response induced for infection and chronic inflammation. We are analysing the involvement of TLR/NIK/c-rel/NFAT/Cox-2/prostaglandins (PGs) in novel functions of the immune system and in inflammatory pathologies as Atherosclerosis, Obesity Cancer and Graft versus host disease. We have unravelled a link between TLRs and c-rel and NFAT activation. Those transcription factors regulate some important mediators of the inflammatory cascade, as Cox-2, increase inflammatory responses. Besides, PGs trigger migration of activation of macrophages and T lymphocytes, including the duration of antigen presenting cell interaction with T lymphocytes. TLR2-TLR4/NFATc2-NFATc4 differentially controls the expression of some adipogenic genes and repressed the antiadipogenic ones in adipocytes, promoting or preventing Obesity. Finally, we have identified PMEPA1 and DUSP10 as Cox-2 induced molecules that controls differentiation and stress response, respectively, key in promoting tumorigenicity on colon or ovarian carcinoma.

Different genetic lineages have been defined in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. However, understanding of their comparative biology and pathogenesis is fragmentary. Besides, the underlying cause of the pathogenesis of this disease (autoimmunity vs parasite mediated inflammation) is controversial. We have defined the protective immune mechanism and the double-edge role of NO and myeloid derived suppressor cells (MDSC) and other immunopathogenic mechanisms. Th1/Th17/Treg/MDSC balance determines resistance/susceptibility in murine Chagas's disease, depending on both host genetics and parasite strain. In general, Th1 are protective but need to be counterbalanced by Tregs to avoid excessive inflammatory damage. Th17 effect depends on host genetic and parasite background. Arginase I+ MDSC plays a detrimental role. Their blockade ameliorates disease. Besides, we are studying how the parasite enters, infects and escapes destruction by myeloid cells, defining Slamf1 as a new *T. cruzi* receptor. All intended for improved understanding and prevention of Chagas' disease.

Publicaciones / Publications

- Aquilino, C., Gonzalez Rubio, M.L., Seco, E.M., Escudero, L., Corvo, L., Soto, M., Fresno, M., Malpartida, F., and Bonay, P. (2012). Differential trypanocidal activity of novel macrolide antibiotics; correlation to genetic lineage. *PLoS One* **7**, e40901.
- Calderon, J., Maganto-Garcia, E., Punzon, C., Carrion, J., Terhorst, C., and Fresno, M. (2012). The Receptor Slamf1 on the Surface of Myeloid Lineage Cells Controls Susceptibility to Infection by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* **8**, e1002799.
- Calvo-Alvarez, E., Guerrero, N.A., Alvarez-Velilla, R., Prada, C.F., Requena, J.M., Punzon, C., Llamas, M.A., Arevalo, F.J., Rivas, L., Fresno, M., Perez-Pertejo, Y., Balana-Fouce, R., and Reguera, R.M. (2012). Appraisal of a *Leishmania* major strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both in vitro and in vivo studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1927.
- De La Fuente, H., Perez-Gala, S., Bonay, P., Cruz-Adalia, A., Cibrian, D., Sanchez-Cuellar, S., Dauden, E., Fresno, M., Garcia-Diez, A., and Sanchez-Madrid, F. (2012). Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. *J. Pathol.* **228**, 193-203.
- Diaz-Munoz, M.D., Osma-Garcia, I.C., Fresno, M., and Iniguez, M.A. (2012). Involvement of PGE2 and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. *Biochem. J.* **443**, 451-461.
- Donnini, S., Finetti, F., Terzuoli, E., Giachetti, A., Iniguez, M.A., Hanaka, H., Fresno, M., Radmark, O., and Ziche, M. (2012). EGFR signaling upregulates expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in cancer cells leading to enhanced tumorigenicity. *Oncogene* **31**, 3457-3466.
- Sreeramkumar, V., Fresno, M., and Cuesta, N. (2012). Prostaglandin E(2) and T cells: friends or foes? *Immunol. Cell. Biol.* **90**, 579-586.
- Wang, G., Abadia-Molina, A.C., Berger, S.B., Romero, X., O'keeffe, M.S., Rojas-Barros, D.I., Aleman, M., Liao, G., Maganto-Garcia, E., Fresno, M., Wang, N., Detre, C., and Terhorst, C. (2012). Cutting edge: Slamf8 is a negative regulator of Nox2 activity in macrophages. *J. Immunol.* **188**, 5829-5832.
- Aguado-Fraile, E., Ramos, E., Saenz-Morales, D., Conde, E., Blanco-Sanchez, I., Stamatakis, K., Del Peso, L., Cuppen, E., Brune, B., and Bermejo, M.L. (2012). miR-127 protects proximal tubule cells against ischemia/reperfusion: identification of kinesin family member 3B as miR-127 target. *PLoS One* **7**, e44305.
- Aoki, M.P., Carrera-Silva, E.A., Cuervo, H., Fresno, M., Girones, N., and Gea, S. (2011). Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Parasitol. Res.* **2012**, 737324.
- Alique, M., Calleros, L., Luengo, A., Giera, M., Iniguez, M.A., Punzon, C., Fresno, M., Rodriguez-Puyol, M., and Rodriguez-Puyol, D. (2011). Changes in extracellular matrix composition regulate cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **300**, C907-918.
- Alvarez, S., Blanco, A., Fresno, M., and Munoz-Fernandez, M.A. (2011). TNF-alpha contributes to caspase-3 independent apoptosis in neuroblastoma cells: role of NFAT. *PLoS One* **6**, e16100.
- Fresno, M., Alvarez, R., and Cuesta, N. (2011). Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch Physiol Biochem* **117**, 151-164.

Carrion, J., Folgueira, C., Soto, M., Fresno, M., and Requena, J.M. (2011). *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. *Parasit. Vectors* **4**, 150.

Cuervo, H., Guerrero, N.A., Carbajosa, S., Beschin, A., De Baetselier, P., Girones, N., and Fresno, M. (2011). Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Heart in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Immunol.* **187**, 2656-2665.

Cuesta, N., Martin-Cofreces, N.B., Murga, C., and Van Santen, H.M. Receptors, signaling networks, and disease. *Sci. Signal* **4**, mr3.

Flores-Chavez, M.D., Merino, F.J., Garcia-Bujalance, S., Martin-Rabadan, P., Merino, P., Garcia-Bermejo, I., Delgado, A., Cuadros, J., Pérez, A., Orden, B., Betriu, C., Cañavate, C., Blázquez, D., Salto, E., Villalta, E., Merino, F.J., Rojo, G., Olabarrieta, I., Camaño, I., Beceiro, J., Cuadros, J., Molina, L., González-Granado, L., del Álamo, M., Estévez, M.C., del Mar Santos, M., Flores, M., Penín, M., Martínez, M.R., González, M., Llorente, M., Girones, N., Rojo, P., Merino, P., Jiménez, P., Millán, R., García, S., Gastafuaga, T., Garate, T. (Working Group on Chagas Disease of Autonomous Community of Madrid). (2011) Surveillance of Chagas disease in pregnant women in Madrid, Spain, from 2008 to 2010. *Euro Surveill.* Sep 22;**16**(38) m pii: 19974.

Otras actividades / Other activities

Socio Honorario Sociedad Cubana de Inmunología. Mayo, 2012.

Patentes / Patents

Sánchez López, José M^a, Martínez Insua, Marta, Romero Millán, Francisco, FERNÁNDEZ-MEDARDE, Antonio, FERNÁNDEZ CHIMENO, Rosa Isabel, FRESNO ESCUDERO, Manuel, SÁNCHEZ VALDEPEÑAS, María del Carmen, RAMÍREZ ORELLANA, Manuel. HEXACYCLIC POLYKETIDES AS KINASE INHIBITORS. N. de solicitud: PCT/EP2011/062379 Fecha de prioridad: 19.07.2011 Entidad titular: INSTITUTO BIOMAR, S.A. Empresa/s que la están explotando: INSTITUTO BIOMAR, S.A.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Vinatha Sreeramjumar (2011). Role of Prostaglandin E2 in T cell activation and migration. Universidad Autónoma de Madrid. Convenio de Cotuela UAM-Universidad de San Raffaele (Roma, Italia). Director: Manuel Fresno. Co-directores: Dr. Federico Mayor Menéndez y Dra. Natalia Cuesta.

Jossela Calderón Deago (2011). Implicación del receptor SLAM (CD150) en la infección por *Trypanosoma cruzi*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Manuel Fresno.

Inés Claire García Osma (2012). Prostaglandinas dependientes de ciclooxigenasa-2<: Moléculas clave en el control funcional de los macrófagos. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Manuel Fresno.

Acciones de los prostanoideos en procesos inflamatorios

Prostanoids actions in inflammatory processes



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Miguel Ángel Íñiguez Peña

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Paloma Guillem Llobat
Elena Hernández Subirá
Raquel Nieto Pintado

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Ana Renshaw Calderón

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Blanca Hernando Rodríguez
María Velasco de Andrés

Resumen de investigación

Los prostanoideos y los derivados del colesterol son mediadores lipídicos que juegan un papel esencial en los procesos inflamatorios asociados a diversas patologías, como las enfermedades cardiovasculares. Los prostanoideos participan en la respuesta inflamatoria y ejercen acciones importantes en la fisiopatología cardiovascular, regulando la homeostasis vascular participando en la patogénesis de enfermedades vasculares. Su importancia en la inflamación se pone de relieve por la experiencia clínica con fármacos inhibidores de su producción como los AINEs. A pesar de sus conocidas propiedades anti-inflamatorias, estudios recientes han demostrado que los AINEs selectivos de la ciclooxigenasa-2, presentan un riesgo de efectos secundarios a nivel cardiovascular. Por otro lado, los oxisteroles y drogas que actúan como ligandos de LXR, juegan un papel regulador central en el metabolismo y transporte de lípidos, a través de sus propiedades como reguladores transcripcionales. Además de su función en el metabolismo de lípidos, los LXRs presentan propiedades como moduladores de la respuesta inmune y la inflamación. Estas propiedades han incentivado el estudio de estos agentes con fines terapéuticos en enfermedades cardiovasculares.

Los principales objetivos de nuestra línea de investigación incluyen: el análisis de los efectos de los prostanoideos y los ligandos de LXR en diferentes tipos celulares como leucocitos y cardiomiocitos, entre otros; el estudio de las vías de señalización que median los efectos hipertróficos de los prostanoideos en los cardiomiocitos; y la investigación de la contribución de los prostanoideos y los ligandos de LXR a la progresión del aneurisma aórtico abdominal, mediante el uso de modelos celulares y animales.

El conocimiento de las bases moleculares y celulares de las acciones de prostanoideos y ligandos de LXRs en la fisiopatología cardiovascular tiene especial relevancia, dado el creciente interés sobre las bases moleculares de las patologías cardiovasculares y sobre los mecanismos de intervención farmacológica en las mismas.

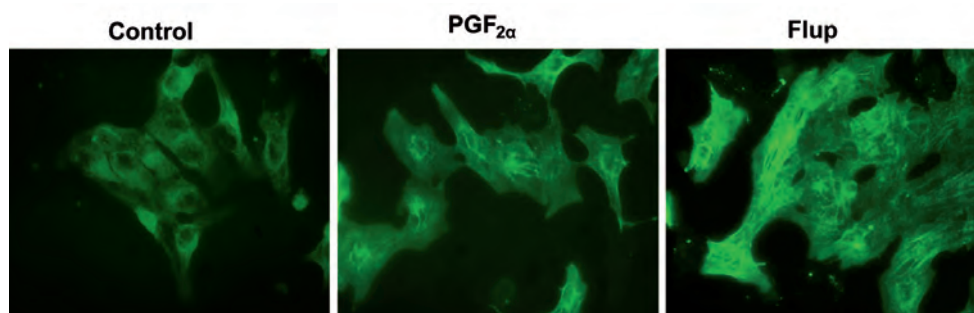


Figura 1. Efecto hipertrófico de agonistas del receptor FP en cardiomiocitos neonatales de rata. Los cardiomiocitos fueron tratados con prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ o Fluprostenol ($1 \mu M$) e identificados con un anticuerpo anti-actina sarcomérica revelado con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (verde). El análisis del área celular puso de manifiesto un incremento en el tamaño celular en las células tratadas con respecto al control.

Figure 1. Hypertrophic effect of FP receptor agonists in rat neonatal cardiomyocytes. Cardiomyocytes were treated with prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ or Fluprostenol ($1 \mu M$) and visualized with an antibody anti-sarcomeric actin revealed with a secondary antibody coupled to Alexa 488 (green). The cell area analysis showed an increase in cell size in the treated cells compared to control.

Research summary

Lipid mediators as prostanoids and cholesterol derivatives play an essential role in inflammatory processes associated to the onset and development of a number of pathologies as cardiovascular diseases. Prostanoids participate in the inflammatory response and exert important actions in the cardiovascular system, modulating vascular homeostasis and participating in the pathogenesis of vascular diseases. Their importance in inflammation and in maintaining cardiovascular homeostasis is highlighted by clinical experience with drugs inhibiting their production as NSAIDs. In spite of their well-known properties as anti-inflammatory drugs, recent studies have shown that cyclooxygenase-2 selective NSAIDs inhibitors increase the risk of adverse cardiovascular side effects. On the other hand, oxysterols and drugs acting as LXR ligands play a central regulatory role in lipid uptake, metabolism and efflux through their properties as transcriptional regulators of gene expression. In addition to their function in lipid metabolism, LXRs have also been found to modulate the immune response and inflammation. These properties have made them particularly attractive targets for intervention in human cardiovascular diseases.

Based on these observations and our previous studies, the main objectives of our line of research include: analysis of the effects of prostanoids and LXR ligands in different cell types as leukocytes and cardiomyocytes, among others; study of the signal transduction pathways mediating hypertrophic effects of prostanoids on cardiomyocytes; and investigation of the contribution of prostanoid –mediated events and LXR ligands to the progression of abdominal aortic aneurysm, by the use of cellular models and an experimental model of this disease in Apo-E null mice and Cox-2 null mice.

Research on the molecular and cellular basis of the actions of prostanoids and LXRs in the cardiovascular pathophysiology is required to clearly understand the benefits and risks of pharmaceutical intervention with COX inhibitors as NSAIDs or synthetic LXR ligands on cardiovascular diseases.

Publicaciones / Publications

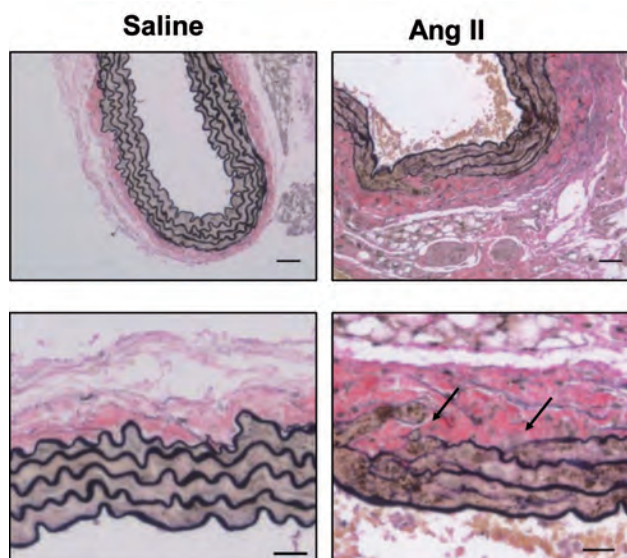
Alique, M. Calleros, L., Luengo, A., Grier, M., Punzón, C., Iñiguez, M.A., Fresno, M., Rodríguez-Puyol, M., and Rodríguez-Puyol, D. (2011) Changes in extracellular matrix composition regulate cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human mesangial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **300**, C907-18.

Donnini S., Finetti F., Terzuoli E., Giachetti A., Iñiguez M.A., Hanaka H., Fresno M., Rådmark O., and Ziche M. (2012) EGFR signaling upregulates expression of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 in cancer cells leading to enhanced tumorigenicity. *Oncogene*. **31**, 3457-3466.

Díaz-Muñoz, M.D, Osma-García, I.C., Fresno, M. and Iñiguez M.A. (2012) Involvement of PGE2 and cyclic AMP signaling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS -activated macrophages. *Biochem J.* **443**, 451-461

Figura 2. Lesiones de aneurisma aórtico abdominal (AAA) en ratones apoE^{-/-} infundidos con Angiotensina II (AngII) o con salino como control. Cortes histológicos de aorta de la región de la lesión de aneurisma, en los que se pueden ver el engrosamiento y dilatación de la pared aórtica, así como las alteraciones en la lámina elástica en los animales tratados con AngII.

Figure 2. Abdominal aortic aneurysm (AAA) formation in apoE^{-/-} mice infused with Angiotensin II (AngII) or saline as a control. Staining of cross sections taken from the suprarenal region of the aorta shows dilatation and thickening of the abdominal aortic wall and alteration of the elastic laminain mice treated with AngII.



Células troncales tumorales

Cancer stem cells



Jefe de Línea / *Group Leader*:
Marta Izquierdo Rojo

Resumen de investigación

Hemos estudiado el potencial terapéutico de la inhibición de la proteína nucleostemina en células troncales tumorales (CSCs, del inglés cancer stem cells) procedentes de pacientes con glioblastomas. La nucleostemina está presente en los nucleolos de células troncales (de ahí su nombre, nucleolo y stem) y en muchos tipos de células tumorales, pero no está presente en las células de los tejidos diferenciados. Hemos utilizado shARNs (ARNs de interferencia) para inhibir la nucleostemina en CSCs encontrando que uno de los shARN diseñados contra la nucleostemina (shRNA22) provoca apoptosis en las células CSCs de pacientes y retrasa significativamente la formación de tumores in vivo. Sin embargo este shRNA22 no parece disminuir ni las concentraciones de ARNm de la nucleostemina ni la proteína correspondiente. La hipótesis de que el shRNA22 podría estar ejerciendo su acción fuera de diana nos impulsó a realizar numerosos experimentos para intentar descubrir la verdadera diana del ARN interferente:

1. Se analizaron los cambios en la actividad transcripcional provocada por el shRNA22 en las CSCs a nivel de genoma completo (*GeneChip Gene 1.0 ST Array System for Human, Affymetrix*). El análisis de los resultados nos indicó que la diana primaria pudiera ser un factor de transcripción relacionado con la vía de señalización de las MAP-quinasas. No se ha podido confirmar o identificar este factor de transcripción.
2. El shRNA22 podría estar actuando como un miRNA. Se realizó una búsqueda en la base de datos PITA en la que se pedían posibles dianas del shRNA22 actuando como miRNA. También se tuvo en cuenta la posible contribución de estructuras secundarias en forma de lazos en los mensajeros. Aunque en principio se obtuvieron varios candidatos, éstos se han ido descartando sucesivamente concluyendo que el shRNA22 no actúa como miRNA en su acción contra los glioblastomas.

En la actualidad se barajan nuevas hipótesis para explicar el comportamiento del shNM22 que serán objeto de una futura investigación.

Research summary

Nucleostemin is preferentially expressed in stem cells and in several transformed cell lines and tumours, but it is abruptly down-regulated during differentiation to terminal cell fate. We have studied the therapeutic potential of depletion of nucleostemin in cancer stem cells. We used shRNAs (small hairpin RNA) to inhibit nucleostemin in glioma cancer stem cells. We found that one of the shRNAs used (shRNA22), induces apoptosis in CSCs and delays substantially the developing of tumors in vivo. Nevertheless, this RNAi does not deplete the nucleostemin RNA or the corresponding protein. The hypothesis that nucleostemin was not the primary target of shRNA22 motivated the following experiments:

1. *We analyzed the genome-wide differentially expressed genes in CSCs-5 after shRNA22 infection, we used Affymetrix GeneChip Gene 1.0 ST Array System containing approximately 28.869 human genes, including the 3' untranslated region (UTR) of the mRNAs that could be a target for binding in a micro (mi)RNA-like manner. The signal transduction pathway with more genes down-regulated was the MAPK kinases pathway. An indication that shRNA22 may be involved in silencing a transcription factor implicated in one of the MAP-kinases signaling-pathways can be suggested although we have no further proof.*
2. *The shRNA22 could be acting as miRNA. This hypothesis was discharged after consulting the PITA data base, not finding any good match.*

New and interesting hypothesis are being consider at present to explain the behavior of shRNA22. Theese will be approached in the near future.

Publicaciones / Publications

Gargini, R., García-Escudero, V. and Izquierdo, M. (2011) Therapy mediated by mitophagy abrogates tumor progression. *Autophagy* **7**, 466-476.

Girald, W., Collin, A. and Izquierdo, M. (2011) Toxicity and delivery methods for the linamarase/linamarin/glucose oxidase system, when used against humanglioma tumors implanted in the brain of nude rats. *Cancer Letters* **313**: 99-107.

Gil-Ranedo, J., Mendiburu-Eliçabe, M., García-Villanueva, M., Medina, D., del Álamo, M. and Izquierdo, M. (2011) An off-target nucleostemin RNAi, inhibits growth in human glioblastoma-derived cancer stem cells. *PLoS One* **6**, 12, e28753.

klionsky, D.J., Izquierdo, M. et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (revision). *Autophagy* **8**, 1-100.

Gil-Ranedo, J., Mendiburu-Eliçabe, M., Izquierdo, M. and Almendral, J.M. (2012) Glioma-parvovirus interactions: molecular insights and therapeutic potential. Capítulo de libro: Glioma/book 3. Novel Therapeutic Concepts in Targeting Glioma. ISBN: 978-953-51-0491-9 Editorial: Tech-Open. Capítulo 8, 144-160.

Fisiopatología molecular del endotelio vascular

Molecular pathophysiology of the vascular endothelium

Jefe de Línea / *Group Leader*:
Santiago Lamas Peláez

Personal Científico / *Scientific Staff*:
Fernando Rodríguez Pascual

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*:
Marta Fierro Fernández
José González Santamaría
Patricia Rodríguez Pérez
Francisco Javier Sánchez Gómez

Becarios Predoctorales / *Graduate Students*:
Rosa M. Bretón Romero
Óscar Busnadiego Prieto
M. Cristina Espinosa Díez
David Lagares Salto
M^a Ángeles Higuera López

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance*:
Macarena Quesada

Eva M Blanco Ruiz
M. Estrella Soria

Estudiantes / *Undergraduate Students*:
Patricia Sanchez
Mónica Escobar
Luis Carlos Suárez Peña

Científicos visitantes / *Visiting Scientists*:
Megha Dubey
Madhu Dikshit
Ankita Misra
Joao Laraninha
Catia Lourenco
Rafael Radi
Gonzalo Peluffo



Resumen de investigación

Nuestro grupo investiga los mecanismos moleculares, bioquímicos y celulares que subyacen a la fisiopatología de la pared vascular. La disfunción endotelial es un proceso consustancial al desarrollo de diversas patologías vasculares como la aterotrombosis, la hipertensión o la diabetes. Este proceso resulta en una deficiente capacidad del endotelio para promover relajación vascular e inhibición de la agregación plaquetaria. Desde hace unos años nuestro grupo estudia el papel de los radicales libres en el desarrollo de disfunción endotelial. Diferentes grupos de investigación incluido el nuestro han mostrado que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) son capaces de promover modificaciones post-traduccionales específicas en proteínas (S-glutacionilación, S-nitrosilación y nitración de tirosinas), las cuales constituyen señales químicas potencialmente relevantes en patofisiología. En particular, nuestro grupo se propone conocer: 1) la identificación de microRNAs modificados por señalización redox en la disfunción endotelial y en fibrosis; 2) el papel de las peroxiredoxinas como sensores redox en la transmisión de señales mecánicas; 3) la caracterización de respuestas redox mediadas por fosfatasa mediante técnicas proteómicas.

En el contexto de los mecanismos moleculares implicados en fisiopatología vascular, nuestro grupo se ha interesado también en el desarrollo de nuevas estrategias antitumorales. En este sentido hemos identificado el ligando no canónico de la ruta de Notch, Dlk-1/Pref1, como un potente inhibidor de angiogénesis y actualmente nos proponemos aplicar estos conocimientos a modelos fisiopatológicos in vivo utilizando células, animales y pacientes.

En los últimos años nuestro grupo ha estudiado también los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de fibrosis tisular, una condición subyacente a muchas enfermedades crónicas. En este contexto nos hemos centrado en la identificación de dianas para la acción de la citoquina profibrótica TGF-beta, como la endotelina-1, y más recientemente la familia de las lisil oxidasa, enzimas responsables de la maduración de la matriz extracelular.

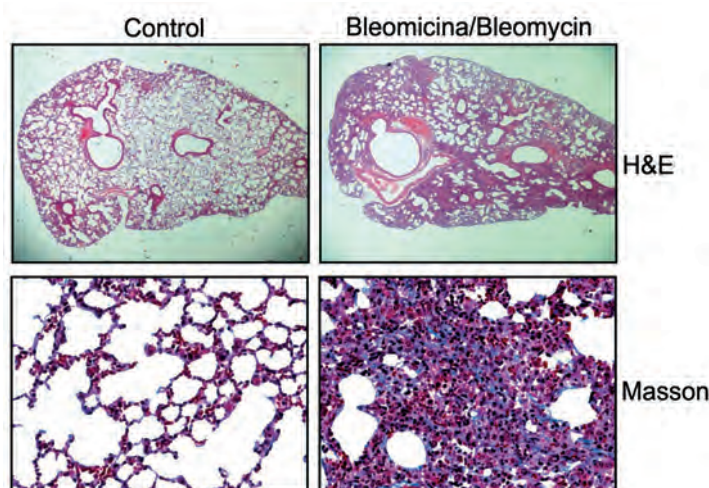


Figura 1. Modelo animal de fibrosis pulmonar. La administración del antibiótico bleomicina induce en ratones el desarrollo progresivo de una fibrosis pulmonar caracterizada por una pérdida de la arquitectura típica de los alvéolos y una acumulación significativa de componentes de matriz extracelular tal y como se determinó mediante examen histológico con hematoxilina/eosina (H&E) y tricrómico de Masson, respectivamente.

Figure 1. Animal model in lung fibrosis. Intratracheal administration of the antibiotic bleomycin to mice promotes the development of a progressive lung fibrosis phenotype characterized by the loss of the typical alveolar architecture of the lung and extensive accumulation of extracellular matrix components as assessed by histological examination with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome histological staining, respectively.

Research summary

Our group investigates the molecular, biochemical, and cellular mechanisms that underlie the pathophysiology of the vascular wall. Endothelial dysfunction is an event inherently related to the development of vascular pathology in humans and associated to disease entities such as atherothrombosis, hypertension or diabetic vascular disease. This process results in an impaired endothelial capacity to promote vascular relaxation and inhibit platelet aggregation. In the last years our group has focused on endothelial dysfunction and redox biology. Several groups including ours have shown that reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) are able to promote specific post-translational modifications in proteins (S-glutathionylation, S-nitrosylation and tyrosine nitration), which constitute chemical signals potentially relevant in cardiovascular pathophysiology. In particular, we plan to : 1) identify microRNAs (miRNAs) modified by oxidative stress or redox signaling with a focus on endothelial dysfunction and organ fibrosis 2) study the role of the essential redox sensors, peroxiredoxins, in mechanotransduction 4) characterize redox responses mediated by phosphatases using high throughput proteomic technologies.

In the context of the molecular mechanisms involved in vascular pathophysiology, our group has been also interested in the development of novel antitumoral strategies. To this respect, we have identified the non-canonical Notch ligand, *Dllk-1/Pref1*, as a potent angiogenesis inhibitor, and we are currently working on the translation of this observation to in vivo models of vascular pathophysiology using cells, animals and patients.

In the last few years we have also studied the molecular mechanisms implicated in the development of tissue fibrosis, a condition underlying a number of chronic diseases. In this context, we have focused on the identification of targets for the action of the profibrotic cytokine, TGF-beta, as endothelin-1, and more recently, the family of lysyl oxidases, enzymes responsible for the maturation of extracellular matrix.

Publicaciones / Publications

Lagares, D., Busnadiego, O., García-Fernández, R.A., Lamas, S., and Rodríguez-Pascual, F. (2012) Adenoviral gene transfer of endothelin-1 in the lung induces pulmonary fibrosis through the activation of focal adhesion kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **47**(6):834-42.

Martínez-Acedo, P., Núñez, E., Gómez, F.J., Moreno, M., Ramos, E., Izquierdo-Álvarez, A., Miró-Casas, E., Mesa, R., Rodríguez, P., Martínez-Ruiz, A., Dorado, D.G., Lamas, S., and Vázquez, J. (2012) A novel strategy for global analysis of the dynamic thiol redox proteome. *Mol Cell Proteomics*. **11**(9):800-13.

Rodríguez-Pascual, F., Busnadiego, O., Lagares, D., and Lamas, S. (2011) Role of endothelin in the cardiovascular system. *Pharmacol Res*. **63**(6):463-472.

Martínez-Ruiz, A., Cadenas, S., and Lamas, S. (2011) Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med*. **51**(1):17-29.

Loureiro, J., Aguilera, A., Selgas, R., Sandoval, P., Albar-Vizcaino, P., Pérez-Lozano, M.L., Ruiz-Carpio, V., Majano, P.L., Lamas, S., Rodríguez-Pascual, F., Borrás-Cuesta, F., Dotor, J., and López-Cabrera, M. (2011) Blocking TGF-β1 protects the peritoneal membrane from dialysate-induced damage. *J Am Soc Nephrol* **22**(9):1682-1695.

Raoch, V., Rodríguez-Pascual, F., López-Martínez, V., Medrano-Andrés, D., Rodríguez-Puyol, M., Lamas, S., Rodríguez-Puyol, D., and López-Ongil, S. (2011) Nitric oxide decreases the expression of endothelin-converting enzyme-1 through mRNA destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **31**(11):2577-2585.

Rodríguez, P., Higuera, M.A., González-Rajal, A., Alfranca, A., Fierro-Fernández, M., García-Fernández, R.A., Ruiz-Hidalgo, M.J., Monsalve, M., Rodríguez-Pascual, F., Redondo, J.M., de la Pompa, J.L., Laborda, J., and Lamas, S. (2012) The non-canonical NOTCH ligand *DLK1* exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovasc Res*. **93**(2):232-241.

Bretón-Romero, R., González de Orduña, C., Romero, N., Sánchez-Gómez, F.J., de Álvaro, C., Porras, A., Rodríguez-Pascual, F., Laranjinha, J., Radi, R., and Lamas, S. (2012) Critical role of hydrogen peroxide signaling in the sequential activation of p38 MAPK and eNOS in laminar shear stress. *Free Radic Biol Med*. **52**(6):1093-1100.

Lagares, D., Busnadiego, O., García-Fernández, R.A., Kapoor, M., Liu, S., Carter, D.E., Abraham, D., Shi-Wen, X., Carreira, P., Fontaine, B.A., Shea, B.S., Tager, A.M., Leask, A., Lamas, S., and Rodríguez-Pascual, F. (2012) Inhibition of focal adhesion kinase prevents experimental lung fibrosis and myofibroblast formation. *Arthritis Rheum*. **64**(5):1653-1664.

Lamas, S., and Rodríguez-Puyol, D. (2012). Endothelial control of vasomotor tone: the kidney perspective. *Semin Nephrol*. **32**(2):156-166.

Otras actividades / Other activities

Organización de actividades I + D.

"Redox signaling and oxidative stress in health and disease IV Spanish and Portuguese meeting on free radicals" Valencia. Junio 2012.

"Workshop on Gasotransmitters in health and disease" Madrid. Enero 2012

"XVII Simposio Internacional del Instituto "Reina Sofía" de Investigaciones Nefrológicas". Noviembre 2011.

"Current Trends In Biomedicine. Molecular and Cellular Bases of Redox Signaling and Oxidative Stress: Implications in Biomedicine". Universidad Internacional de Andalucía. Simposio Internacional Baeza. Noviembre 2011.

Curso de Verano "La fibrosis tisular en la enfermedad humana". Fundación General de la Universidad de Alcalá de Henares. Septiembre 2012.

Patentes / Patents

Solicitud internacional de la patente 201031547 "Uso de *DLK1* como inhibidor de angiogénesis", diciembre 2011.

Tesis doctorales / Doctoral theses

David Lagares Salto (2012) Implicaciones Fisiopatológicas y Terapéuticas del eje TGF-beta/ET-1 y la Quinasa de Adhesión Focal en los procesos Fibróticos. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Santiago Lamas Peláez y Fernando Rodríguez Pascual.

Papel de la transición epitelio-mesénquima de las células mesoteliales en fibrosis y cáncer

Role of the epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells in fibrosis and cancer



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Manuel López Cabrera

Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow:*
Jesús Loureiro Álvarez
Pilar Sandoval Correa
Guadalupe González Mateo
Ignacio Benedicto Español

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Patricia Albar Vicaíno

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Adrián Acuña Ruiz

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
M^a Luisa Pérez Lozano
Vicente Ruiz Carpio
Ángela Rynne Vidal
Georgios Liappas

Resumen de investigación

Nosotros hemos demostrado que las células mesoteliales peritoneales sufren una transición epitelio-mesénquima (TEM) en respuesta a la diálisis peritoneal. Las células mesoteliales transdiferenciadas adquieren características miofibrilares y son capaces de invadir el estroma submesotelial, donde producen gran cantidad de matriz extracelular y de factores angiogénicos e inflamatorios, favoreciendo así los procesos que dan lugar al fallo de membrana. Nuestros datos sugieren que la TEM de las células mesoteliales es un buen marcador del fallo de membrana y podría ser una diana terapéutica para prevenir la fibrosis y/o angiogénesis inducidas por la DP.

Por otro lado, el haber caracterizado el proceso TEM de las células mesoteliales ha dado lugar a una nueva línea de investigación en nuestro grupo, que consiste en analizar el papel de la TEM de las células mesoteliales en la implantación y crecimiento intraperitoneal de tumores metastáticos. Los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) participan en todos los estadios de la progresión tumoral. Sin embargo, el origen de los CAFs no está claramente establecido. En nuestro grupo pretendemos demostrar que en el caso de la metástasis peritoneal los CAFs también pueden derivar de las células mesoteliales vía TEM. El hecho de que las células mesoteliales que han sufrido una TEM produzcan gran cantidad del factor pro-angiogénico VEGF sugiere que estas células podrían jugar un papel importante en la vascularización y crecimiento tumoral.

La finalidad de nuestro trabajo es profundizar en el conocimiento de las implicaciones patológicas de la TEM de las células mesoteliales y de los mecanismos moleculares que regulan dicho proceso. Asimismo, nos interesa la identificación de dianas moleculares para el diseño de estrategias terapéuticas, con posibles aplicaciones en enfermedades que cursan con la fibrosis/angiogénesis peritoneal y en la metástasis peritoneal.



Figura 1. En el peritoneo se generan nuevas células fibroblásticas a través de la conversión local de las células mesoteliales (MCs) por transición epitelio mesénquima (TEM), durante la diálisis peritoneal. Las MCs transdiferenciadas invaden el estroma submesotelial y allí participan en los procesos de fibrosis y angiogénesis, que posteriormente darán lugar al fallo de ultrafiltración peritoneal.

Figure 1. In the peritoneum new fibroblast-like cells arise from local conversion of mesothelial cells (MCs) by epithelial to mesenchymal transition (EMT) during peritoneal dialysis. Trans-differentiated MCs invade the submesothelial stroma, where they participate in the fibrotic and angiogenic processes, which ultimately lead to peritoneal ultrafiltration failure.

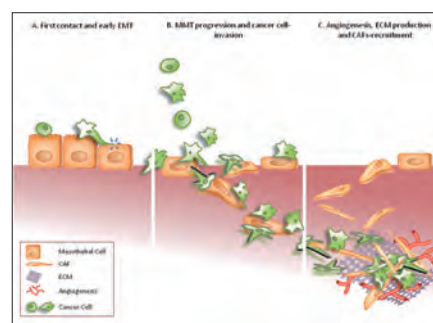


Figura 2. La diseminación peritoneal es una ruta frecuente de metástasis para los cánceres de ovario y del tracto gastrointestinal. Nosotros hemos demostrado que en los implantes metastáticos peritoneales una subpoblación de fibroblastos asociados a carcinoma (CAFs) derivan de las células mesoteliales vía transición mesotelio mesénquima (MMT). Además, la MMT promueve la adhesión e invasión de las células tumorales.

Figure 2. Peritoneal dissemination is a frequent metastatic route for cancers of the ovary and gastrointestinal tract. We have shown that in peritoneal metastatic implants a sub-population of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) derives from mesothelial cells through mesothelial to mesenchymal transition (MMT). Moreover, MMT promotes the adhesion and invasion of tumor cells.

Research summary

We have demonstrated that peritoneal mesothelial cells undergo an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in response to dialysis. Transdifferentiated mesothelial cells acquire myofibroblastic characteristics and are capable of invading the submesothelial stroma, where they produce large amounts of extracellular matrix, as well as angiogenic and inflammatory factors, thus favouring the processes that lead to membrane failure. Our data suggest that the EMT of mesothelial cells is a good marker of membrane failure and could be a therapeutic target to prevent PD-induced fibrosis and/or angiogenesis.

Furthermore, characterization of the EMT process of mesothelial cells has opened a new line of research for our group, which consists of analyzing the role of transdifferentiation of mesothelial cells in the intraperitoneal implantation and growth of metastatic tumors. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) participate in all stages of tumor progression. However, the origin of CAFs has not been clearly established. Our group is trying to demonstrate that in the case of peritoneal metastasis, CAFs may also derive from mesothelial cells via EMT. The fact that mesothelial cells that have undergone EMT produce large amounts of the pro-angiogenic factor VEGF suggests that these cells may play an important role in tumour vascularisation and growth.

The aim of this our work is to expand the knowledge of the pathological implications of the EMT of mesothelial cells and the molecular mechanisms that regulate this process, in addition, we are aimed to identify molecular targets for the design of therapeutic strategies, with possible applications in diseases associated with peritoneal fibrosis/angiogenesis, and in peritoneal metastasis.

Publicaciones / Publications

Molina-Jiménez, F., Benedicto, I., Dao Thi, V.L., Gondar, V., Lavillette, D., Marin, J.J., Briz, O., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., Baumert, T.F., Cosset, F.L., López-Cabrera, M., and Majano PL (2012). Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle. *Virology* **425**; 31-39.

Conde, E., Alegre, L., Blanco-Sánchez, I., Sáenz-Morales, D., Aguado-Fraile, E., Ponte, B., Ramos, E., Sáiz, A., Jiménez, C., Ordoñez, A., López-Cabrera, M., del Peso, L., de Landázuri, M.O., Liaño, F., Selgas, R., Sánchez-Tomero, J.A., and García-Bermejo, M.L. (2012). Hypoxia inducible factor 1- α (HIF-1 α) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PLoS One* **7**; e33258.

Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., García-Buey, L., Gondar, V., López-Cabrera, M., Moreno-Otero, R., and Majano, P.L. (2012). Role of tight junctions in hepatitis C virus infection. *Rev Esp Enferm Dig.* **104**; 255-263.

González-Mateo, G.T., Aroeira, L.S., López-Cabrera, M., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., and Selgas, R. (2012). Pharmacological modulation of peritoneal injury induced by dialysis fluids: is it an option? *Nephrol Dial Transplant.* **27**; 478-481.

Strippoli R, Benedicto I, Perez Lozano ML, Pellinen T, Sandoval P, López-Cabrera M, del Pozo, M.A. (2012). Inhibition of transforming growth factor-activated kinase 1 (TAK1) blocks and reverses epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells. *PLoS One.* **7**; e31492.

Fernández-Perpén, A., Pérez-Lozano, M.L., Bajo, M.A., Albar-Vizcaino, P., Sandoval, P., del Peso, G., Castro, M.J., Aguilera, A., Ossorio, M., Meter, M.E., Passlick-Deetjen, J., Aroeira, L.S., Selgas, R., López-Cabrera, M., and Sánchez-Tomero, J.A. (2012). Influence of bicarbonate/low-GDP peritoneal dialysis fluid (BicaVera) on *in vitro* and *ex vivo* epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *Perit Dial Int* **32**; 292-304.

Loureiro, J., Aguilera, A., Selgas, R., Sandoval, P., Albar-Vizcaino, P., Pérez-Lozano, M.L., Ruiz-Carpio, V., Majano, P.L., Lamas, S., Rodríguez-Pascual, F., Borrás-Cuesta, F., Dotor, J., and López-Cabrera, M. (2011). Blocking TGF- β 1 Protects the Peritoneal Membrane from Dialysate-Induced Damage. *J Am Soc Nephrol* **22**; 1682-1695.

Bajo, M.A., Pérez-Lozano, M.L., Albar-Vizcaino, P., Del Peso, G., Castro, M.J., Gonzalez-Mateo, G., Fernández-Perpén, A., Aguilera, A., Sánchez-Villanueva, R., Sánchez-Tomero, J.A., López-Cabrera, M., Peter, M.E., Passlick-Deetjen, J., and Selgas, R. (2011). Low-GDP peritoneal dialysis fluid ('balance') has less impact *in vitro* and *ex vivo* on epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of mesothelial cells than a standard fluid. *Nephrol Dial Transplant.* **26**; 282-291

Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Moreno-Otero, R., López-Cabrera, M. and Majano, P.L. (2011). Interplay among cell polarization, lipoprotein metabolism and hepatitis C virus entry. *World J. Gastroenterol.* **17**; 2683-2690.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Guadalupe Tirma González Mateo (2011). Caracterización y modulación de la inflamación peritoneal para limitar la fibrosis causada por el líquido de diálisis: modelo de ratón. Universidad Complutense de Madrid. Director: Manuel López Cabrera y Rafael Selgas Gutiérrez.

Ignacio Benedicto Español (2011). Interrelación entre proteínas asociadas a uniones intercelulares estrechas, polaridad de los hepatocitos y el virus de la hepatitis C. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Manuel López Cabrera y Pedro Lorenzo Majano Rodríguez.

Jesús Loureiro Álvarez (2011). Transición epitelio-mesénquimal como diana terapéutica en modelos experimentales de diálisis peritoneal. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Manuel López Cabrera.

Mecanismo de asociación de HLA-B27 con espondiloartropatías (JALC)

Mechanism of association of HLA-B27 with spondyloarthropathies (JALC)



Jefe de Línea / Group Leader:
José A. López de Castro

Personal Científico / Scientific Staff:
Luis C. Antón

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Patricia Gómez

Becarios Predoctorales / Graduate Students:

Carlos Álvarez Navarro
Noel García Medel
Lorena López
Adrián Martín Esteban
Alejandro Sanz Bravo
Dung Van Nguyen

Resumen de investigación

El papel patogénico de HLA-B27 en espondilitis anquilosante (AS) es un problema mayor en la inmunopatología del MHC. El peptidoma es crucial porque determina la especificidad inmunológica de HLA-B27, su plegamiento y estabilidad. De acuerdo a esta idea, ERAP1, una aminopeptidasa del retículo endoplásmico que recorta péptidos para su unión óptima a MHC-I, está también asociada con AS. En los dos últimos años hemos analizado, usando espectrometría de masas comparativa, el papel del proteasoma y de ERAP1 en configurar los peptidomas de HLA-B27 y de HLA-A68, que comparte con HLA-B27 algunas características significativas de unión peptídica. El peptidoma de HLA-A68 resistente a inhibidores de proteasoma reveló que éstos no consiguen una inhibición total, alterando sustancialmente los patrones de especificidad hidrolítica. Sin embargo, dichas alteraciones no conllevan una expresión aumentada de epítomos que podrían ser destruidos por un proteasoma intacto. Más bien, ante una inhibición incompleta del proteasoma, el procesamiento post-proteasómico de proteínas parcialmente degradadas parece ser responsable de una restitución substancial del peptidoma de MHC-I. En relación a ERAP1, hemos demostrado, por primera vez *in vivo*, una influencia muy extensa de las variantes naturales de esta enzima en el peptidoma de HLA-B27. El mecanismo es una alteración dependiente de alotipo en el balance entre la generación y la destrucción de epítomos. El polimorfismo de ERAP1 asociado con susceptibilidad a AS implica un aumento en la actividad enzimática. El polimorfismo protector, conlleva una actividad disminuida, un peptidoma subóptimo y menor estabilidad de HLA-B27.

MECANISMOS REGULADORES DE LA PROTEOSTASIS EN CELULAS TUMORALES (LCA). Mediante la utilización de sondas específicas hemos identificado vías relevantes en la adaptación de células tumorales al estrés proteotóxico basal, así como dianas potenciales para la manipulación de tales vías, en particular miembros de la familia de la ubiquitin-hidrolasas.w

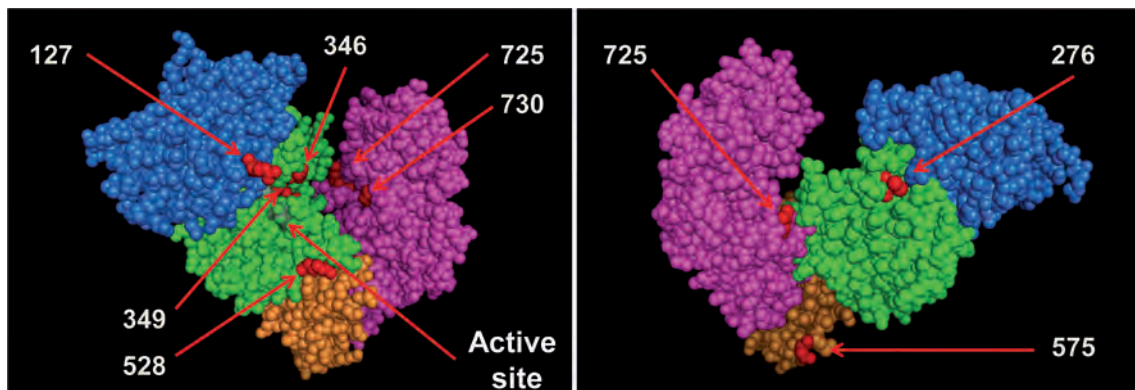


Figura 1. Localización del polimorfismo natural de ERAP1 asociado con AS en la estructura tridimensional. Los residuos polimórficos se sitúan en áreas con influencia potencial en la unión del sustrato o en la actividad catalítica.

Figure 1. Localization of natural AS-associated polymorphism in the three-dimensional structure of ERAP1. Polymorphic residues are located in areas that potentially influence substrate binding or catalytic activity.

Research summary

The pathogenetic role of HLA-B27 in ankylosing spondylitis (AS) is among the most challenging issues in MHC immunopathology. The HLA-B27 peptidome is crucial, as it determines the immunological features of HLA-B27, its folding and stability. This concept is strongly supported by the association of ERAP1, an aminopeptidase of the endoplasmic reticulum that trims peptides to their optimal length for MHC-I binding, with AS. In the last two years our laboratory focused on the role of the proteasome and ERAP1 in shaping the peptidomes of HLA-B27 and a second MHC-I molecule, HLA-A68, that shares with HLA-B27 some peptide binding features, using comparative mass spectrometry. The proteasome-inhibitor-resistant HLA-A68 peptidome revealed that proteasome inhibitors fail to achieve total inhibition, substantially altering proteasomal cleavage patterns. Yet, these alterations did not increase the expression of MHC-I epitopes that might be destroyed by an intact proteasome. Rather, it appears that, upon incomplete proteasomal inhibition, post-proteasomal processing results in a substantial generation of inhibitor-resistant MHC-I ligands from incompletely degraded proteins. Concerning ERAP1, we demonstrated, for the first time in vivo, that natural ERAP1 variants have an extensive influence on the HLA-B27 peptidome. The mechanism of functional ERAP1/HLA-B27 interaction in AS is an allotype-dependent alteration in the balance between epitope generation and destruction. ERAP1 polymorphism associated with AS susceptibility ensured efficient peptide trimming and high HLA-B27 stability. Protective polymorphism resulted in diminished ERAP1 activity, suboptimal HLA-B27 peptidomes and decreased molecular stability.

PATHWAYS REGULATING PROTEOSTASIS IN TUMOR CELLS (LCA). Using specific activity probes we have identified some pathways crucial for the survival of tumor cell lines, allowing their adaptation to their constitutive proteotoxic stress. We also identified potential targets that would allow the manipulation of this adaptation, in particular members of the ubiquitin-hydrolase family.

Publicaciones / Publications

García-Medel, N., Sanz, A., Barnea, E., Admon, A., and Jose A. López de Castro, J.A. (2012). The origin of proteasome-inhibitor resistant HLA class I peptidomes: a study with HLA-A*68:01. *Mol. Cell. Proteomics* **11**: 1-15.

doi: 10.1074/mcp.M111.011486. PM:21969608.

García-Medel, N., Sanz-Bravo, A., Van Nguyen, D., Galocha, B., Gómez-Molina, P., Martín-Esteban, A., Alvarez-Navarro, C., and López de Castro, J.A. (2012) Functional Interaction of the Ankylosing Spondylitis Associated Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Polymorphism and HLA-B27 *in vivo*. *Mol. Cell. Proteomics*. **11**: 1416-1429. doi:10.1074/mcp.M112.019588. PM:22918227.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Noel García-Medel (2012). Contribución del proteasoma y del polimorfismo de ERAP1 en la configuración y patogenicidad de los peptidomas constitutivos de MHC-I: Estudios en HLA-A68 y HLA-B27. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José A. López de Castro.

Laboratorio de polaridad epitelial

Epithelial polarity laboratory



Jefe de Línea / *Group Leader*:
Fernando Martín Belmonte

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*:
Inmaculada Bañón
Ilenia Bernascone

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Alejo Ezequiel Rodríguez Fraticelli
Manuel Ángel Gálvez Santisteban
Mariam Hachimi
Minerva Bosch Fortea

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Arantxa Borreguero Pascual:
Lorena Vázquez Rioja

Estudiantes / *Undergraduate Students*:
Rocío Aguilar Cuenca

Resumen de investigación

El interés principal de nuestro grupo es estudiar los procesos de morfogénesis y polaridad epitelial, así como su implicación en algunas patologías humanas como el cáncer. El modelo *in vitro* en el que se basan nuestras investigaciones es el cultivo organotípico en tres dimensiones de células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (3D MDCK). Como modelos *in vivo*, empleamos conductos del pronefros y intestino de pez cebra (*Danio rerio*). Asimismo, hemos iniciado una nueva vía de investigación centrada en el uso de células madre embrionarias (ES) para abordar dichas cuestiones.

El sistema de célula epitelial 3D-MDCK es uno de los mejores modelos *in vitro* para la investigación de la polaridad celular durante la morfogénesis epitelial (Rodríguez-Fraticelli et al., 2011). Sin embargo, este modelo no puede reconstituir la complejidad de la arquitectura que se da *in vivo*, que incluye diferentes tipos celulares, la remodelación dinámica y la homeostasis tisular. Es por esto que el empleo de sistemas *in vivo* podría servir para validar y caracterizar mejor los fenotipos observados *in vitro*. El pez cebra ha mostrado ser un excelente modelo para la caracterización (*in vivo*) de los mecanismos de formación del lumen identificados en el sistema 3D-MDCK. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que las proteínas de polaridad gobiernan la orientación del huso mitótico en las células madre y en el desarrollo epitelial. Además, la conexión entre la pérdida de la polaridad celular, los defectos en los procesos de división asimétrica y la iniciación de tumores es uno de los descubrimientos más sorprendentes e importantes en el campo de la biología del cáncer de los últimos 10 años.

Por tanto, nuestras investigaciones se centran actualmente en el estudio de las proteínas que regulan la formación del lumen durante el desarrollo epitelial y, particularmente, en dos aspectos esenciales de este proceso: el tráfico de membranas y la orientación del huso mitótico.

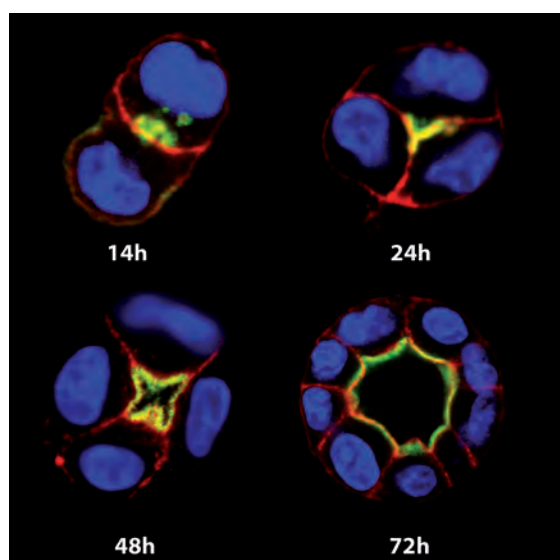


Figura 1. Diferentes etapas en la formación de cistos con un lumen central de células MDCKII cultivadas en 3D (Matrigel). En verde Slp2a, en rojo actina y en azul núcleos.

Figure 1. Characterization of cysts lumen formation in 3D MDCK cells: Slp2a (Green), actin (red) and DNA (blue).

Research summary

Our main scientific interest is the understanding of epithelial morphogenesis and polarity, as well as their implication in human diseases, such as cancer. We are currently using an organotypic 3-dimensional in vitro model as a basic model system for our research, as well as the zebrafish pronephros and gut epithelial morphogenesis as an in vivo system. In addition, we have initiated a new research direction by using embryonic stem cells (ES) to address these issues.

We are extremely interested in the development of epithelial cell polarity. On the basis of data from simple models, such as cultured mammalian cells, we are beginning to understand the mechanisms that control the establishment and maintenance of epithelial cell polarity and tissue integrity. The Madin-Darby canine kidney (3D MDCK) epithelial cell system is one of the best in vitro models for investigating cell polarity during epithelial morphogenesis (Rodríguez-Fraticelli et al., 2011). However, this model cannot reconstitute the complexity of the in vivo architecture, which includes different cell types, dynamic remodeling, and tissue homeostasis. For this reason, the use of in vivo systems would serve to validate and further characterize the phenotypes observed in vitro. Zebrafish is an excellent model for characterizing (in vivo) the mechanisms for lumen formation identified in the 3D-MDCK system. In addition, it has been recently demonstrated that the core polarity proteins govern spindle orientation in stem cells and epithelial development. Furthermore, the connection between the loss of cell polarity, defective asymmetric cell division and tumor initiation is one of the most surprising and important findings in the field of cancer biology in the past 10 years.

Thus, we are focusing on the analysis of proteins that regulate lumen formation in epithelial development, and particularly on two essential aspects: membrane trafficking and spindle orientation.

Publicaciones / Publications

Rodríguez-Fraticelli, A.E., Azuan, M.A., Alonso, M.A., Bornens, M., and Martín-Belmonte, F. (2012). Cell confinement controls lumen initiation and centrosome positioning during epithelial morphogenesis. *J. Cell Biol.* **198**(6):1011-23.

Gálvez-Santisteban, M., Rodríguez-Fraticelli, A.E., Bryant, D.M., Vargarajauregui, S., Yasuda, T., Bañón-Rodríguez, I., Bernascone, I., Datta, A., Spivak, N., Young, K., Slim, C.L., Brakeman, P.R., Fukuda, M., Mostov, K.E., and Martín-Belmonte, F. (2012) Synaptotagmin-like proteins control the formation of a single apical membrane domain in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* **(8)**:838-49

Martín-Belmonte, F., and Pérez-Moreno, M. (2011) Epithelial cell polarity, stem cells and cáncer. *Nat. Rev. Cancer* **12**(1):23-38.

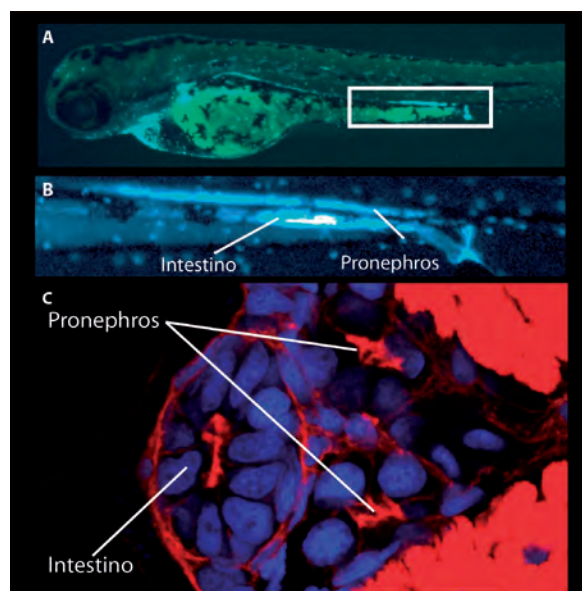
Rodríguez-Fraticelli, A.E., Gálvez-Santisteban, M., and Martín-Belmonte, F. (2011) Divide and polarize: recent advances in the molecular mechanism regulating epithelial tubulogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* **23**(5):638-46.

Patentes / Patents

Methods and a device for the formation of 3D-multicellular assemblies. Country EU and USA. Applicant: CYTOO and Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Filing Date: July 25, 2011. Filing Number: 61/511, 232

Figura 2. A) Pez zebra transgénico que expresa un marcador epitelial unido a GFP, que marca específicamente los túbulos epiteliales de interés, el intestino y el pronephros (riñón primordial) B) Magnificación. C) Corte transversal de embrión de pez zebra, donde se identifican los túbulos epiteliales que conforman el pronephros y el intestino.

Figure 2. Transgenic zebrafish line expressing a GFP-tagged epithelial marker that stains the epithelial tubes of the gut and pronephros B) Magnification. C) Zebrafish embryo cross-section showing the epithelial tubes of the gut and pronephros.



Receptores acoplados a proteínas G: redes de señalización e implicaciones fisiopatológicas

G protein-coupled receptor networks: signal transduction and pathophysiological implications



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Federico Mayor Menéndez

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Cristina Murga
Petronila Penela
Catalina Ribas

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Vanessa Lafarga (hasta Abril 2011)
Rocío Vila Bedmar

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Sofía Cabezu
Elisa Lucas
Adolfo Javier Molejón

Laura Nogués
Julia Palacios
Clara Reglero
Guzmán Sánchez-Fernández

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Paula Ramos
Verónica Rivas
Susana Rojo-Berciano
Almudena Santos

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Marián Hernández-Colina
(Convenio UAM-Universidad
de La Habana. Mayo-Junio, 2011)

Resumen de investigación

Las GRKs (G protein-coupled receptor kinases) son importantes nodos en las redes de señalización celular. Tras identificarse inicialmente como reguladores de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) más recientemente se han puesto de manifiesto (con la activa participación de nuestro grupo) nuevas funciones, en particular para la ubi- y esencial isoforma GRK2. Esta quinasa puede fosforilar sustratos no-GPCR o interactuar con diversas proteínas señalizadoras, y estas nuevas interacciones contribuyen a explicar la participación de GRK2 en procesos celulares básicos como ciclo celular, migración o resistencia a insulina. También se han descrito complejos mecanismos de regulación de la expresión y actividad de GRK2, y esos parámetros están alterados en diversas enfermedades de gran relevancia.

El descifrado del interactoma de GRK2 relevante en distintos tipos celulares y/o contextos fisiológicos y patológicos específicos puede ayudar a entender aspectos claves acerca de la organización de las redes de señalización celular. Por otra parte, el uso combinado de modelos celulares y animales con expresión o funcionalidad de GRK2 alterada (a nivel sistémico o de forma específica de tipo celular) permitirá evaluar la contribución de esta quinasa a procesos celulares esenciales, así como el impacto funcional de cambios en los niveles de GRK2 en patologías cardiovasculares, inflamatorias, diabetes/obesidad o progresión tumoral. Estos aspectos son críticos para explorar la posibilidad de utilizar GRK2 como biomarcador y/o el diseño de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la actividad, niveles o interacciones específicas de esta proteína. Además, nuestro grupo también está implicado en la identificación de nuevas vías de señalización cardiovascular mediadas por GPCR acoplados a Gq y en el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en una familia de inhibidores de p38MAPK patentada por nuestro laboratorio.

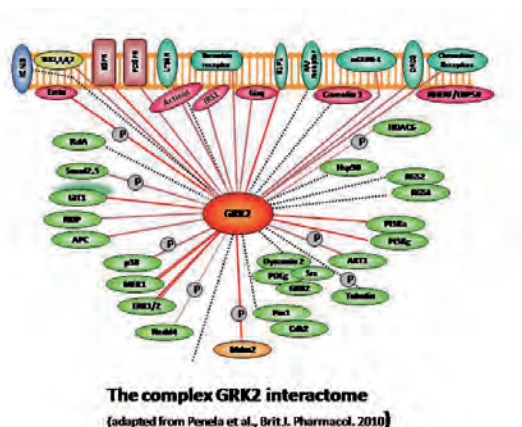


Figura 1. El complejo interactoma GRK2 (adaptado de Penela y cols. *Brit J Pharmacol*, 2010).

Figure 1. The complex GRK2 interactome (Adapted from Penela et al., *Brit J Pharmacol*, 2010).



Figura 2. Implicaciones fisiopatológicas del interactoma GRK2.

Figure 2. Pathophysiological implications of the GRK2 interactome.

Research summary

G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) is emerging as a key node in signal transduction pathways. GRKs were initially identified as negative regulators of G protein-coupled receptors (GPCR). However, recent evidence is putting forward (with an active participation of our group) novel roles for GRKs, and in particular for the ubiquitous and essential GRK2 isoform. GRK2 is also able to phosphorylate a variety of non-GPCR substrates and to dynamically interact with other important signal transduction partners in a kinase activity-independent manner. Our group has demonstrated that some of such interactions underlie the participation of GRK2 in basic cellular processes such as cell cycle, cell migration or insulin resistance, and also identified complex mechanisms that regulate GRK2 expression levels and activity, parameters known to be altered in very relevant pathological situations.

We postulate that deciphering the relevant GRK2 interactomes in different cell types and signalling contexts in response to specific stimuli will help to understand key aspects about the organization and cross-modulation of signal transduction networks. Moreover, the combined use of cellular and animal models with altered GRK2 dosage or functionality (either systemic hemizygous mice, conditional or tissue-specific knock-outs) would allow to unveil the contribution of GRK2 to basic cellular processes and to further explore the implication of GRK2 in pathophysiological situations such as cardiovascular disease, inflammation, diabetes /obesity and tumor progression. This is critical to assess the feasibility of GRK2 as a useful diagnostic biomarker and/or of new therapeutic strategies based on the modulation of the activity, levels or specific interactions of this protein. In addition, our group is also involved in sorting out new signaling routes downstream of Gq-coupled cardiovascular GPCR relevant for cardiac hypertrophy and in developing therapeutic strategies based in a new family of docking groove-targeted p38MAPK inhibitors patented by our laboratory.

Publicaciones / Publications

Penela, P., Lafarga, V., Tapia, O., Rivas, V., Nogues, L., Lucas, E., Vila-Bedmar, R., Murga, C., and Mayor, F., Jr. (2012) Roles of GRK2 in cell signaling beyond GPCR desensitization: GRK2-HDAC6 interaction modulates cell spreading and motility. *Sci. Signal* **5**(224): pt3.

Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L., Nieto-Vazquez, I., Mayor, F., Jr., Lorenzo, M., Murga, C., and Fernandez-Veledo, S. (2012) GRK2 contribution to the regulation of energy expenditure and brown fat function. *FASEB J.* **26**, 3503-3514.

Garcia-Hoz, C., Sanchez-Fernandez, G., Garcia-Escudero, R., Fernandez-Velasco, M., Palacios-Garcia, J., Ruiz-Meana, M., Diaz-Meco, M.T., Leitges, M., Moscat, J., Garcia-Dorado, D., Bosca, L., Mayor, F. Jr., and Ribas, C. (2012) Protein kinase C (PKC)zeta-mediated Galphag stimulation of ERK5 protein pathway in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **287**, 7792-7802.

Lafarga, V., Aymerich, I., Tapia, O., Mayor, F., Jr., and Penela, P. (2012) A novel GRK2/HDAC6 interaction modulates cell spreading and motility. *EMBO J.* **31**, 856-869.

Lafarga, V., Mayor, F., Jr., and Penela, P. (2012) The interplay between G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) and histone deacetylase 6 (HDAC6) at the crossroads of epithelial cell motility. *Cell Adh. Migr.* **6**, 495-501.

Buitrago-Perez, A., Hachimi, M., Duenas, M., Lloveras, B., Santos, A., Holguin, A., Duarte, B., Santiago, J.L., Akgul, B., Rodriguez-Peralto, J.L., Storey, A., Ribas, C., Larcher, F., del Rio, M., Paramio, J.M. and Garcia-Escudero, R. (2012) A humanized mouse model of HPV-associated pathology driven by E7 expression. *PLoS One* **7**:e41743. doi: 10.1371/journal.pone.0041743.

Aymerich, M.S., Lopez-Azcarate, J., Bonaventura, J., Navarro, G., Fernandez-Suarez, D., Casado, V., Mayor, F., Lluís, C., Valencia, M., Artieda, J. and Franco, R. (2011) Real-time G-protein-coupled receptor imaging to understand and quantify receptor dynamics. *Scientific World Journal* **11**, 1995-2010.

Sorribes, A., Armendariz, B.G., Lopez-Pigozzi, D., Murga C., de Polavieja, G.G. (2011) The origin of behavioral bursts in decision-making circuitry. *PLoS Comput. Biol.* **7**(6):e1002075.

Cuesta, N., Martín-Cófreces, N.B., Murga, C., van Santen, H.M. (2011) Receptors, signaling networks, and disease. *Sci Signal.* **4**(161):mr3.

Mayor, F., Jr., Lucas, E., Jurado-Pueyo, M., Garcia-Guerra, L., Nieto-Vazquez, I., Vila-Bedmar, R., Fernandez-Veledo, S., and Murga, C. (2011) G Protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): A novel modulator of insulin resistance. *Arch. Physiol. Biochem.* **117**: 125-130.

Molnar, C., Ruiz-Gomez, A., Martin, M., Rojo-Berciano, S., Mayor, F., and de Celis, J.F. (2011) Role of the Drosophila non-visual ss-arrestin kurtz in hedgehog signalling. *PLoS Genet* **7**(3): e1001335.

Nogues, L., Salcedo, A., Mayor, F., Jr., and Penela, P. (2011) Multiple scaffolding functions of {beta}-arrestins in the degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **286**, 1165-1173.

F. Mayor, Jr., Penela, P., Ribas, C. and Murga, C. (2011) The complex role of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in cell signalling: beyond GPCR desensitization , In G protein-coupled receptors: From structure to function (Jesús Giraldo and Jean-Philippe Pin, eds.), RSC Drug Discovery Series No. 8, The Royal Society of Chemistry UK, Chapter 16, pp. 316-334.

Patentes / Patents

F. Mayor, C. Murga, P. Campos, A. Morreale, CJ Heijnen, A Kavelaars. p38 inhibitor peptides and applications. PCT/ES2011/070774, Universidad Autónoma de Madrid.

F. Mayor, C. Murga, P. Campos, A. Morreale, CJ Heijnen, A Kavelaars. Protection of the effects of p38 inhibitory compounds. P201131754 (Spain). Universidad Autónoma de Madrid.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Vinatha Sreeramkumar (2011). Role of Prostaglandin E2 in T cell activation and migration. Universidad: Universidad Autónoma de Madrid. Co-directores: Manuel Fresno, Federico Mayor Menéndez y Natalia Cuesta.

Otras actividades / Other activities

Director del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid/ Chairman, Department of Molecular Biology. Universidad Autónoma de Madrid (2005-).

Presidente de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). 2012-2016 /President, Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology (SEBBM, 2012-2016.).

Miembro del Consejo Asesor de Sanidad / Member of the Advisory Board of the Spanish Minister of Health.

Miembro del Consejo Científico de la Fundación Lilly /Member of the Scientific Committee of the Lilly Foundation (2001-).

Miembro de Consejos Científicos Asesores / Member of Scientific Advisory boards: Institut Pi i Sunyer de Investigaciones Biomédicas (IDIBAPS) (2004-); Parque Científico de Madrid (2007-); Instituto de Investigación Sanitaria de La Princesa (2010-).

Cristina Murga: Coordinadora del Máster en Biomedicina Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid/ Coordinator, Master in Molecular Biomedicine, Universidad Autónoma de Madrid.

Mecanismos moleculares de interacción virus-célula: el modelo del virus de la peste porcina africana

Virus Cell Interaction. The ASFV Model



Jefe de Línea / *Group Leader*:
Yolanda Revilla Novella

Personal Científico / *Scientific Staff*:
Ricardo Madrid González

Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*:
Daniel Pérez Núñez

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Elena García Sánchez
Ana Quintas Gorozarri

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Susana Barroso Fernández
María Luisa Nogal París

Resumen de investigación

El VPPA es un virus DNA de gran tamaño que infecta monocitos y macrófagos de diferentes especies porcinas, causando una enfermedad aguda, frecuentemente fatal, de enorme importancia económica en el mundo. Resulta interesante que el VPPA haya desarrollado una serie de estrategias de escape ante la respuesta inmune, inflamatoria y apoptótica, muchas de ellas descritas por nuestro grupo años atrás. Recientemente, nuestro laboratorio también ha mostrado que en células infectadas el IF4e/4G se redistribuyen junto a las factorías virales, junto a los ribosomas y la red mitocondrial y son usados para la síntesis de proteínas virales. Finalmente, nuestro último trabajo demuestra que el ASFV entra en las células hospedadoras por un proceso de macropinocitosis, induciendo la polarización de actina hacia los sitios de entrada así como la activación de EGFR, PI3K-Akt, Pak1 y Rac1 por debajo de la membrana. Estas rutas podrían activar los sistemas de defensa innata como la señalización de los receptores Toll hacia la apoptosis o podría activar procesos esenciales para la replicación viral.

A pesar de los notables esfuerzos realizados durante las últimas décadas con el fin de obtener una vacuna preventiva eficiente frente a la infección por el VPPA, aún estamos lejos de conseguirlo. Por tanto, uno de los objetivos de nuestro laboratorio es el desarrollo de una vacuna efectiva contra el VPPA. Para ello, hemos diseñado dos estrategias: 1) la obtención de aislados atenuados mediante el desarrollo eficiente de mutantes por eliminación seriada de los genes virales; 2) la identificación de antígenos relevantes y el desarrollo de vacunas ADN. Ya que los adyuvantes son clave en el desarrollo de diferentes tipos de respuesta inmune, se analizarán aquellos adyuvantes dirigidos frente receptores de la respuesta inmune innata en combinación con las potenciales vacunas con el fin de inducir respuestas inmunitarias protectoras frente al VPPA.

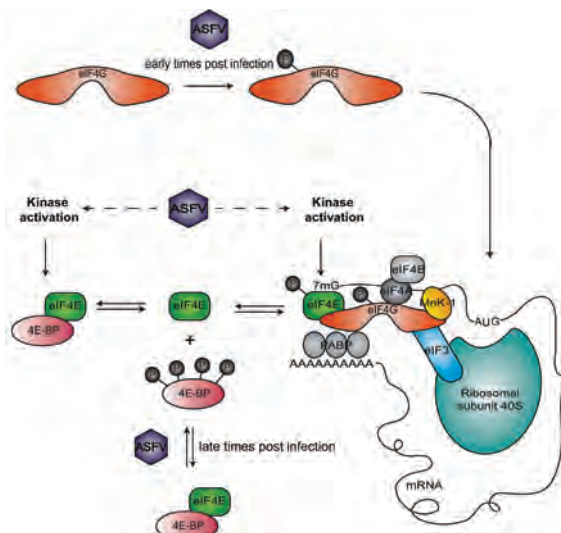


Figura 1. La infección de VPPA promueve la traducción cap-dependiente. Activación de eIF4E y eIF4G durante la infección. Inducción de la fosforilación de eIF4E, eIF4G y del represor de eIF4E, 4E-BP. eIF, eukaryotic translation initiation factor; 4E-BP, eIF4E binding protein, Mnk-1, mitogen activated kinase 1; ASFV, virus de la peste porcina Africana.

Figure 1. ASFV infection promotes cap-dependent translation. Activation of eIF4E and eIF4G during ASFV infection. ASFV promotes phosphorylation of eIF4E, eIF4G and the repressor of eIF4E, 4E-BP. eIF, eukaryotic translation initiation factor; 4E-BP, eIF4E binding protein, Mnk-1, mitogen activated kinase 1; ASFV, African Swine Fever Virus.

Research summary

ASFV is a large DNA virus that infects monocytes/macrophages of different species of suids, causing the acute, economically important and frequently fatal ASF. Our group has described that ASFV, like other complex DNA viruses, deploys a variety of strategies to evade the host's defense systems, such as inflammatory and immune responses and cell death. We also demonstrated that ASFV regulates and redistributes the cellular machinery to synthesize viral proteins while impairing the production of cellular proteins. In fact, eIF4E/ 4G have been found close to viral factories, besides ribosomes, and the mitochondrial network; furthermore, phosphorylation cascades and signal transduction pathways are also handled by the virus.

Importantly, we have recently described that ASFV enters to the host cells by macropinocytosis, directly inducing actin polarization as well as EGFR, PI3K-Akt, Pak1 and Rac1 activation. These pathways may activate innate host defense systems such as Toll-like receptor signaling of apoptosis or they may activate processes essential for the virus to replicate. Further characterization of the virus proteins involved in the binding and entry process will identify new pathways and virus targets for vaccine development and will also identify virus genes which may be deleted to construct attenuated ASFV strains.

Despite the notable efforts done during the last decades to obtain a preventive vaccine against ASFV infection, currently we are still far to succeed. Thus, one of our main interests is the development of a efficient vaccine against ASF. For this purpose, two approaches will be followed: 1) the rational development of ASFV deletion mutants as candidate vaccine strains, and 2) the identification of protective antigens and development of DNA vaccines. Since adjuvants are key in triggering different types of immune response, adjuvants targeted to innate immune receptors will be tested in combination with those vaccines to induce protective immune responses.

Publicaciones / Publications

G. Sánchez, E., Quintas, A., Pérez-Núñez, D., Nogal, M.L., Barroso, S., L. Carrascosa, A., and Revilla, Y. (2012). African Swine Fever Virus Uses Macropinocytosis to Enter Host Cells. *PLoS Pathogens*, 8(6): e1002754.

Jiménez, J.L., Gómez, R., Briz, V., Madrid, R., Bryszews, M., de la Mata, F.J., and Muñoz-Fernández, M.A. (2012) Carbosilane dendrimers as carriers of siRNA. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, 22: 75-82.

Briz, V., Serramía, M.J., Madrid, R., Turrin, C.O., Caminade, A.M., Majoral, J.P., and Muñoz-Fernández, M.A. (2012) Validation of a Generation 4 Phosphorus-Containing Polycationic Dendrimer for Gene Delivery against HIV-1. *Curr Med Chem*, 19(29):5044-5051.

Otras actividades / Other activities

Organization of international conferences (steering and/or program committees).

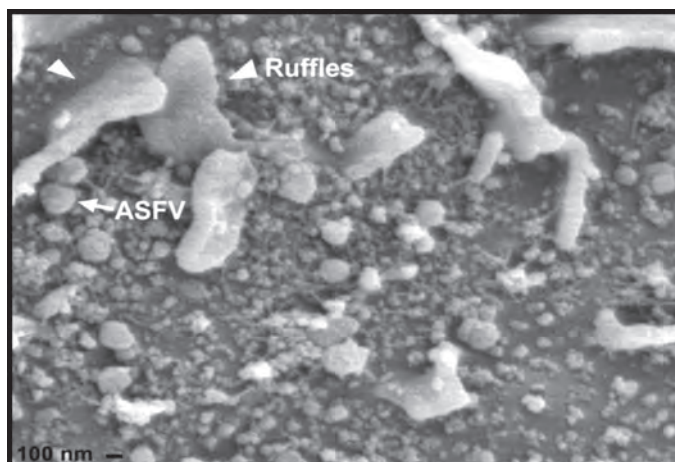
Yolanda Revilla: IX International Congress of Veterinary Virology "One World, One Health, One Virology". University Complutense. Madrid, 4-7 September 2012. Member of Scientific Committee. Chairman.

Figura 2. Inducción de "ruffles" durante la entrada del VPPA. El VPPA usa la macropinocitosis para entrar en la célula huésped, induciendo protrusiones en la membrana citoplasmática, las cuales dependen de la reestructuración del esqueleto de actina y de la activación de varias quinasas y Rho GTPasas.

Imagen de microscopía electrónica de barrido mostrando los ruffles inducidos por el VPPA (200nm) para entrar en la célula huésped.

Figure 2. Ruffles induction upon African Swine Fever Virus Entry. Macropinocytosis/endocytic pathway is used by ASFV to enter cells triggering plasma membrane protrusions that depend on extensive actin cytoskeleton restructuring as well as activation of several kinases and Rho GTPases.

Field Emission Scanning Electron Microscopy shows ruffles induced by ASFV through which the virus (200 nm) enters into the cell.



Homeostasis metabólica

Metabolic homeostasis



Jefe de Línea / *Group Leader*:
Ignacio Vicente-Sandoval

Personal Científico / *Scientific Staff*:
Diego Pulido
Vassiliki Lalioti

Postdoctoral / *Postdoctoral Fellow*:
Mariana Todorova

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Lilian Gallego

Resumen de investigación

En el año 2011 obtuvimos financiación del FIS para estudiar los mecanismos moleculares implicados en el tráfico y función del transportador hepático de Cu ATP7B en el contexto de la enfermedad de Wilson, toxicosis por retención del Cu causada por mutaciones que frecuentemente afectan el tráfico del transportador. En el 2012 obtuvimos fondos de la Fundación Areces que apoyan esta misma investigación. Investigamos los mecanismos que son activados por el aumento de los niveles del Cu en el hepatocito y ocasionan la translocación de ATP7B desde el Golgi a la membrana del canalículo biliar, mecanismos que son desconocidos. Estudiamos si la activación incluye un efecto directo del Cu sobre ATP7B y otro indirecto a través de las vías PI3K y AMPK, y si en este contexto que adaptadores de clatrina (API, GGAs) y que Rabs (Rab11a, Rab10) y que reguladores de su actividad (TBC1D4 y TBC1D1). Nuestros resultados son por el momento prometedores pero inciertos. También estudiamos la asociación de ATP7B con las "tight junctions" y su significado funcional.

En el año 2012 obtuvimos financiación del programa del MINECO "Explora", programa cuyo slogan es "Atrévete a Equivocarte". Estudiamos el por qué la célula ensambla en su citoplasma una estructura monocopia que se presenta en dos formas toroide y bastoncillo. Hemos avanzado en la comprensión de su ensamblaje y naturaleza. Así mismo hemos finalizado el estudio de AMFIÓN un nuevo regulador regulador de HDACs que funciona en el nucléolo, Golgi y "midbody".

El 2012 fue un año de sabático en el Departamento de Biología Celular de la Duke University (NC, USA), la estancia fue financiada por el programa Salvador de Madariaga (ME) e iLINK (CSIC).

Research summary

Wilson is a severe inherited copper(Cu) toxicosis. The condition is produced by mutations in the ATP7B gene, a membrane channel involved in the excretion of excess Cu into the bile. We investigate the mechanisms regulated by Cu that facilitate the translocation of ATP7B from the Golgi to the bile canaliculus (BC), mechanisms that remain essentially unknown and are often impaired by the ATP7B mutations. The main targets of our research are: the role of the Cu binding to ATP7B in its release from the Golgi; the possible regulation of the ATP7B traffic by the signaling of Cu through the PI3K/Akt/TOR and the LKB/MNK pathways; the operation of clathrin adaptors (AP1, GGAs) and Rabs (Rab11, Rab10) and their regulators (TBC1D4 y TBC1D1) in the Cu-regulated translocation of ATP7B to the BC. Our results are promising but uncertain. In the same frame work we study the function of a small population of ATP7B associated with the tight junctions that seal the BC. The above research is founded by grants from the FIS (2011) and the Fundación Areces (2012).

We separately investigate the nature and function of a new cellular structure and specifically its protein composition and assembly, and the possible correlation between its changes in shape and function. This research was supported by a grant from the program EXPLORA (MINECO, 2012).

In 2012 two of us worked for 8 and 4 months at the department of Cell Biology of Duke University (NC, USA), the stay was supported by grants from the program Salvador de Madariaga (ME) and iLINK (CSIC).

Óxido nítrico y respuesta inmune adaptativa: regulación y función de la actividad óxido nítrico sintasa en la activación y diferenciación de los linfocitos T

Nitric oxide and adaptive immune response: regulation and function of nitric oxide synthase activity in the activation and differentiation of T lymphocytes



Jefe de Línea / Group Leader:
Juan Manuel Serrador Peiró

Becarios Predoctorales / Graduate
Students:
Almudena García Ortiz

Estudiantes / Undergraduate
Students:
Angel Bago Plaza
Elena de la Fuente Oliva
Juan Antonio Muner Hernando

Resumen de investigación

El principal interés de nuestras investigaciones se centra en el estudio del papel desempeñado por el óxido nítrico (NO) en la regulación de la respuesta inmune adaptativa asociada con el daño tisular que se observa en algunas de las enfermedades de origen autoinmune con mayor impacto en salud pública, ahondando en el estudio de sus bases moleculares. Nuestro grupo está especialmente interesado en el estudio del papel desempeñado por el NO en la diferenciación y activación de los linfocitos T, y su repercusión en el curso de la enfermedad autoinmune. Existen sólidas evidencias de que el NO juega un papel importante en la generación y exacerbación de los procesos inflamatorios crónicos. Recientemente hemos demostrado que los linfocitos T expresan eNOS y que la actividad de esta enzima regula la activación de los linfocitos T en la sinapsis inmune, una estructura intercelular establecida durante la interacción antígeno-específica entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno (APC).

Estudios llevados a cabo en colaboración muestran que durante la interacción antígeno-específica entre ambos tipos celulares, las mitocondrias se organizan junto al anillo periférico de actina, lo que sugiere que éstas podrían aportar la energía requerida para la movilización de receptores de señalización hacia la zona central de la sinapsis inmune. En este sentido, nuestros estudios han mostrado que eNOS se activa principalmente en las proximidades de la sinapsis inmune, regulando la organización del receptor de la célula T en el área central de señalización. En la actualidad, nuestra investigación está dirigida a estudiar los mecanismos por los que eNOS puede regular la organización de receptores en la sinapsis inmune y si dicha acción puede desempeñar un papel importante en la diferenciación de los linfocitos T hacia fenotipos Th1, Th2, Treg y/o Th17.

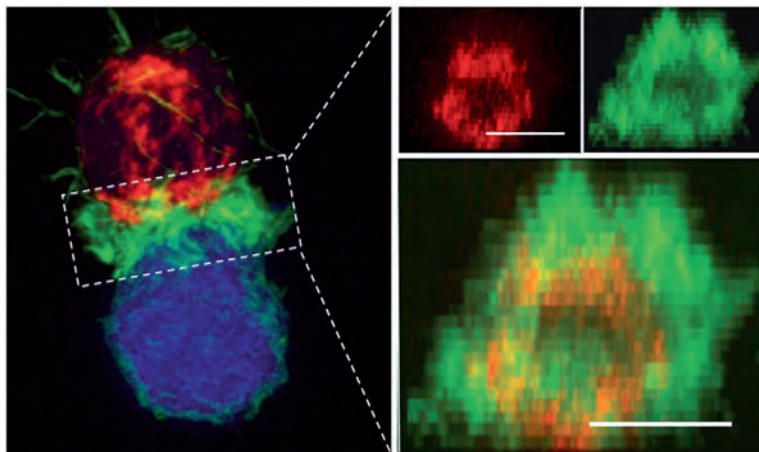


Figura 1. Proyecciones máximas en el plano Z correspondientes a un conjugado celular entre una célula T marcada con "Mitotracker Orange" para tinción de mitocondrias (rojo) y una célula B Raji pulsada con superantígeno E y marcada con la sonda fluorescente CMAC (azul). Las células fueron teñidas con faloidina-Alexa 488 (verde) para observar el anillo periférico de F-actina y la localización de las mitocondrias en los agregados supramoleculares periféricos de activación (pSMAC). Los paneles de la derecha muestran la disposición de las mitocondrias y microfilamentos en reconstrucciones 3D de la sinapsis inmune. Escala de barras: 5 μ m.

Figure 1. Maximum projection of a confocal Z-stack of a cell conjugate between a T cell loaded with Mitotracker Orange to stain mitochondria (red) and a superantigen E-pulsed Raji B cell stained with CMAC (blue). Cells were also stained with phalloidin-Alexa 488 (green) to determine the peripheral ring of F-actin and the localization of mitochondria near the peripheral supramolecular activation clusters (pSMAC). Right panels show the localization of mitochondria and microfilaments in maximal projections of 3D reconstructions from the immune synapse. Scale bars: 5 μ m.

Research summary

The scientific major interest of our group is focused on the study of nitric oxide (NO) and the regulation of the adaptive immune responses associated with the degenerative damage in autoimmune-related diseases with major public health impact, chiefly underlying the cellular and molecular basis of these pathological processes. We are particularly interested in the study of the role played by NO on the differentiation and activation of T lymphocytes and its consequences on the course of autoimmunity. There are evidences indicating a role for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the genesis and exacerbation of chronic inflammation. More recently, we have also demonstrated that T lymphocytes express eNOS and that eNOS-derived NO regulates antigen-dependent T lymphocyte activation at the immune synapse, a specialized intercellular structure involved in the regulation of TCR signalling.

Moreover, in collaborative studies we have found that during antigen-specific T cell-APC interactions, mitochondria are organized near the peripheral actin ring of the immune synapse, suggesting that from this cellular domain mitochondria control T cell activation by fuelling T cell receptor assembling at the central area of the immune synapse. In this regard, our studies have shown that eNOS results preferentially activated on the Golgi complex at the vicinity of the immune synapse, regulating the localization of receptors at the central area of activation. Currently, the scientific priority of our studies is to explore whether eNOS-derived NO from antigen-stimulated T lymphocytes plays a major role in Th1, Th2, Treg and/or Th17 cell differentiation.

Publicaciones / Publications

Baixauli, F., Martín-Cófreces, N.B., Morlino, G., Carrasco, Y.R., Calabia-Linares, C., Veiga, E., Serrador, J.M. and Sánchez-Madrid, F. (2011) The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *EMBO J.* **30**, 1238-1250

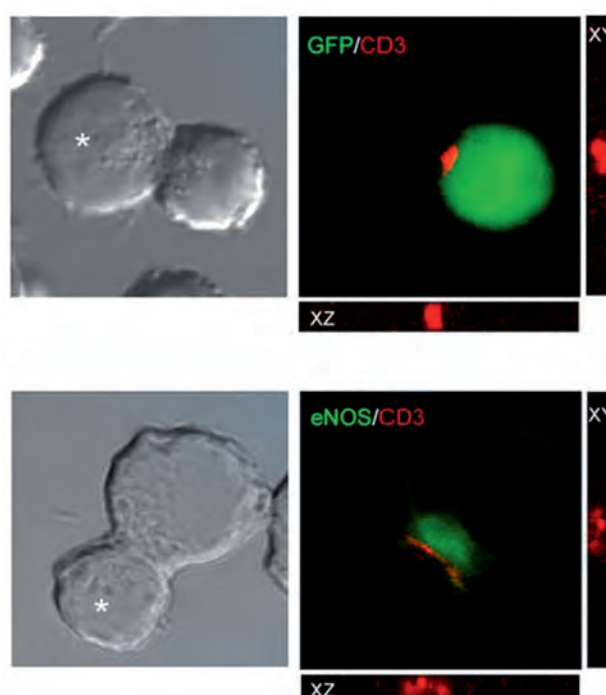


Figura 2. Localización de CD3 (rojo) en la sinapsis inmune de células T que expresan GFP o eNOS-GFP (verde) conjugadas con células B Raji pulsadas con superantígeno E (asterisco en las imágenes DIC). Destacar que mientras CD3 muestra una localización dispersa en la sinapsis inmune de células T que expresan eNOS-GFP, su localización está mucho más concentrada en la sinapsis inmune de células T control que expresan GFP. Se muestran las correspondientes proyecciones de los planos X-Y y X-Z.

Figure 2. Localization of CD3 (red) at the immune synapse of T cells expressing GFP or eNOS-GFP (green) conjugated with superantigen E-pulsed Raji B cells (asterisk on DIC images). Note that CD3 is dispersed at the immune synapse of eNOS-expressing T cells but concentrated at the central area of the immune synapse of control GFP-expressing T cells. The corresponding X-Y and X-Z plane projections of the cell-cell contact area are shown for each condition.

Desarrollo del sistema linfohematopoyético humano

Development of the human lymphohematopoietic system



Jefe de Línea / Group Leader:
María Luisa Toribio García

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Marina García Peydró
Patricia Fuentes Villarejo
Enrique Martín Gayo
Sara González García

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
María Jesús García León
Marta Mosquera Sáiz
Olga Lancho Medina

Técnico de Investigación / Technical Assistance:

Juan Alcain Sánchez
Teresa Bermejo Pastor

Escuela Taller Severo Ochoa
Paloma Domínguez Sánchez

Estudiantes / Undergraduate Students:
Raquel Toribio Fernández
Mercedes Pérez Olivares
Dylan James Mac Lochlainn

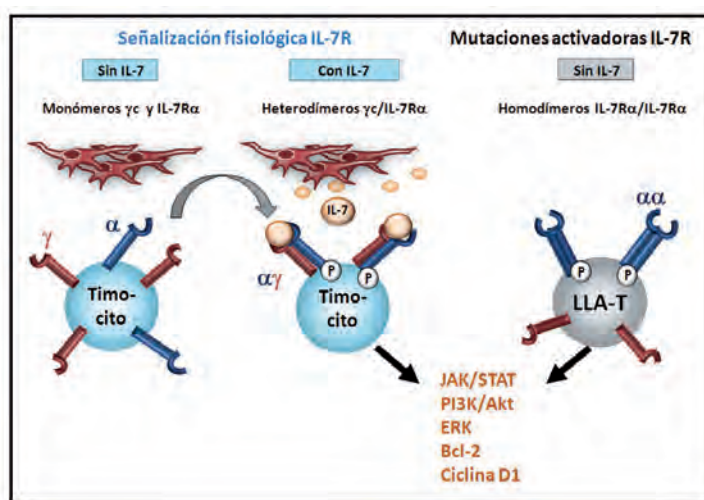
Resumen de investigación

Nuestro grupo estudia las bases moleculares y celulares que determinan la especificación de las células madre y los progenitores hematopoyéticos (HSC/HPCs) y su diferenciación en el timo humano. Utilizando aproximaciones genéticas de pérdida y ganancia de función, ensayos de diferenciación, y reconstitución hematopoyética en ratones humanizados, pretendemos identificar reguladores del desarrollo fisiológico y patológico de los linfocitos T y de los componentes no-T intratímicos, en particular de las células dendríticas. Estudiamos además la regulación espacio-temporal de los ligandos de la vía de Notch en el timo y su implicación en la especificación funcional de los timocitos. Nuestro objetivo es obtener información relevante sobre los mecanismos que regulan la proliferación y diferenciación de los progenitores HSC/HPCs, para trasladar este conocimiento al diseño de terapias regenerativas y estrategias terapéuticas frente a dianas moleculares específicas implicadas en leucemia.

En los últimos años, hemos prestado especial atención a los efectores de Notch1, un receptor esencial en el desarrollo de los linfocitos T e implicado en la generación de la leucemia linfoblástica aguda T (T-ALL). Nuestros estudios han demostrado que el receptor para el factor de crecimiento interleuquina-7 (*IL7R*) es una diana transcripcional de Notch1 en los progenitores de los linfocitos T y en la T-ALL. La relevancia patológica de este hallazgo se ve reforzada por el descubrimiento de que *IL7R* es un oncogen, ya que hemos identificado mutaciones de ganancia de función en *IL7R* en un 9% de las T-ALL, que dan lugar a la formación de un receptor que señaliza de forma constitutiva e independientemente de IL-7. Además, hemos identificado mecanismos de regulación mutua entre IL-7R y Notch1 implicados en el control de la proliferación de las T-ALL, lo que refuerza la relevancia del IL-7R como diana terapéutica. En colaboración con la Dra Bovolenta, nuestros estudios más recientes se han centrado en la regulación de Notch por moduladores de Wnt, tales como las proteínas SFRP, y su implicación en hematopoyesis y en leucemia.

Figura 1. Señalización fisiológica y patológica del IL-7R en el desarrollo de los linfocitos T y en las leucemias T-ALL con mutaciones activadoras en el gen *IL7R*, respectivamente.

Figure 1. Physiological and pathological IL-7R signalling in developing T cells and in T-ALL with activating *IL7R* mutations, respectively.



Research summary

Our research is aimed at investigating the cellular and molecular bases of cell fate specification of human hematopoietic stem and progenitor cells (HSC/HPCs), with special emphasis on thymopoiesis and T-cell development. Based on loss- and gain-of-function genetic approaches, cell differentiation assays, and hematolymphoid reconstitution of humanized mice, we aim to identify molecular regulators that control physiological and pathological development of human T lymphocytes, and non-T cell intrathymic components such as dendritic cells. We also investigate how the spatial/temporal distribution of Notch ligands within the thymus niche can regulate functional specification of developing thymocytes. Our purpose is to provide novel information on the mechanisms of HSC/HPCs self-renewal and differentiation, of relevance for developing regenerative therapies and therapeutic strategies against specific targets involved in leukemia.

In the last years, we paid special attention to molecular effectors of Notch1, a cell surface signaling receptor which is crucial for T-cell development and is critically involved in the generation of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Our studies have shown that the receptor for interleukin 7 (IL-7R) is a transcriptional target of Notch1 in T-cell progenitors as well as in T-ALL cells. The pathological relevance of these findings is further supported by our recent results showing that IL7R is an oncogene, which is mutated in about 9% of T-ALL patients. The identified IL7R gain-of-function activating mutations result in the formation of a constitutively active IL-7R which signals independently of IL-7. Additional studies have provided evidence that IL-7R and Notch1 interplay controls T-ALL cell proliferation, which highlights the relevance of IL-7R as a specific therapeutic target in T-ALL. More recent studies carried out in collaboration with Dr. Bovolenta have focused on Notch signalling regulation by Wnt modulators; particularly, Secreted Frizzled-Related Proteins (SFRP), and their implication in hematopoiesis and leukemia.

Publicaciones / Publications

Zenatti PP, Ribeiro D, Li W, Zuurbier L, Silva MC, Paganin M, Tritapoe J, Hixon JA, Silveira AB, Cardoso BA, Sarmiento LM, Correia N, Toribio ML, Kobarg J, Horstmann M, Pieters R, Brandalise SR, Ferrando AA, Meijerink JP, Durum SK, Yunes JA, Barata JT. (2011) Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genet.* **43**: 932-939.

Esteve, P., Sandonis, A., Cardozo, M., Malapeira, J., Ibañez, C., Crespo, I., Marcos, S., Gonzalez-Garcia, S, Toribio, M.L., Arribas, J., Shimono, A., Guerrero, I. and Bovolenta, P. (2011) Secreted Frizzled-Related Proteins act as negative modulators of ADAM10 metalloproteinase activity during retinal neurogenesis. *Nature Neurosci.* **14**: 562-569.

González-García S, García-Peydró M, Alcain J, Toribio ML. (2012) Notch1 and IL-7 receptor signalling in early T-cell development and leukemia. *Curr. Opin. Microbiol. Immunol.* **360**: 47-73.

Benitez-Ribas D, Borràs FE, del Val M, Lasarte JJ, Marañón C, Martín-Gayo E, Sarobe P, Toribio ML, Montoya M. (2012) Dendritic cells: Nearly 40 years later. *Inmunología* **31**:49-57.

Rubio R, Gutierrez-Aranda, I, Sáez-Castillo AI, Labarga A, Rosu-Myles M, Gonzalez-García S, Toribio ML, Menendez P, Rodriguez, R. (2012) The differentiation stage of p53-Rb-deficient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development. *Oncogene* 10Dec.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Sara González García (2011). Cooperación funcional de Notch1 e IL-7R en el desarrollo de los linfocitos T humanos y en la fisiopatología de la leucemia T linfoblástica aguda. Universidad Autónoma de Madrid.

Sobresaliente *cum laude*.

Directora: María Luisa Toribio.

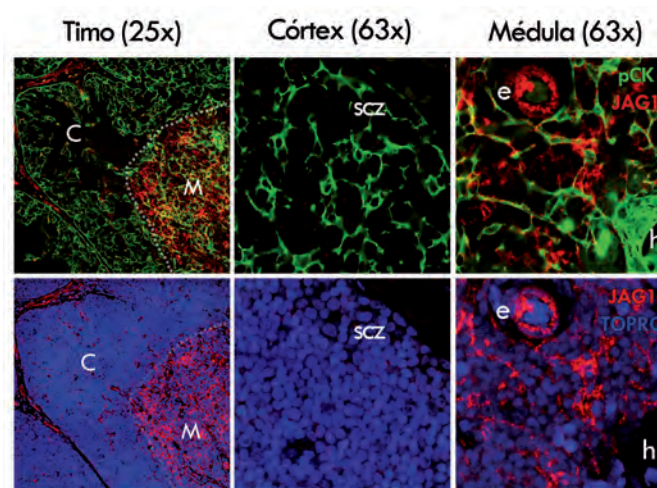
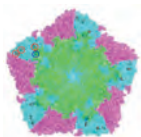
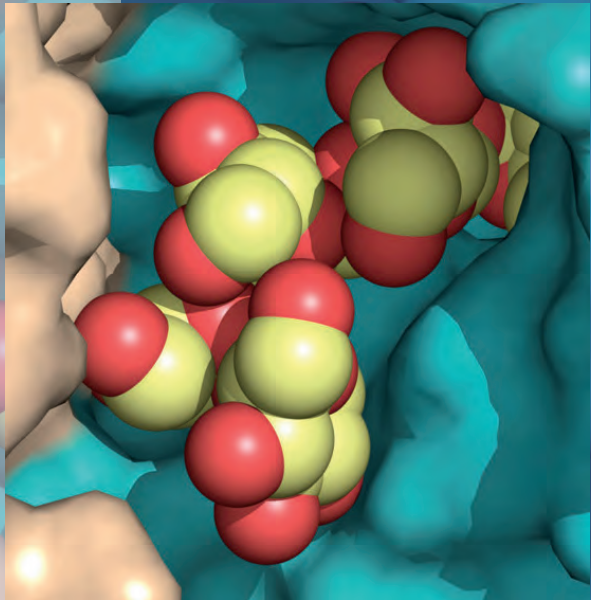


Figura 2. Expresión del ligando de Notch JAG1 en timo humano. C: corteza; M: médula; SCZ: región subcapsular; h: corpúsculo de Hassall; e: endotelio vascular.

Figure 2. Expression of Notch ligand JAG1 in human thymus. C: cortex; M: medulla; SCZ: subcapsular zone; h: Hassall corpuscle; e: vascular endothelium.

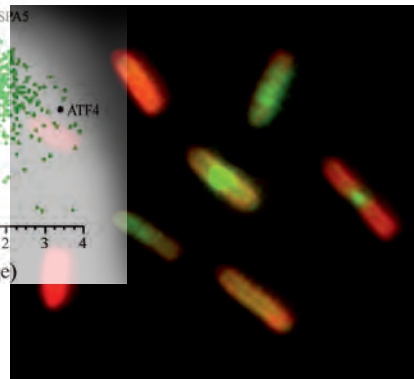
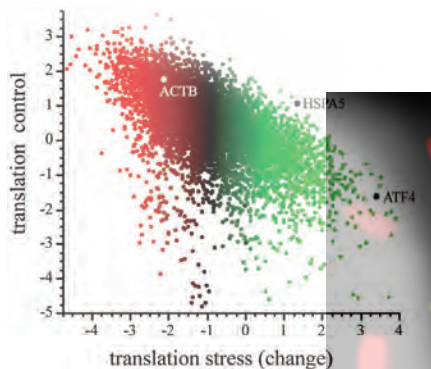
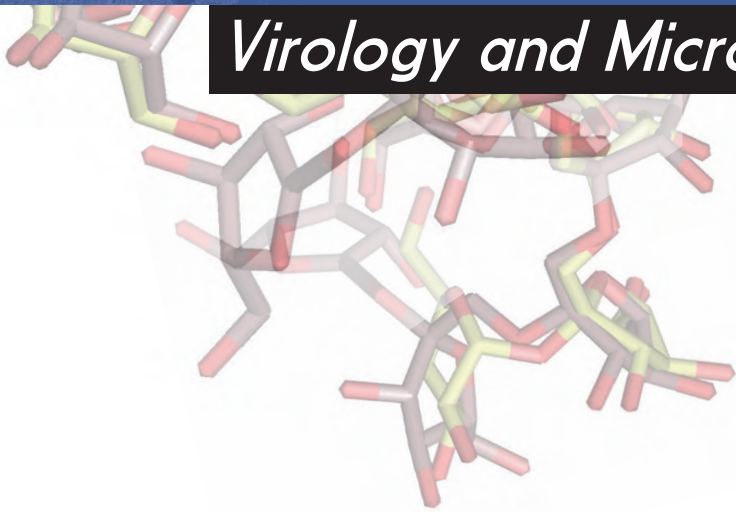
56	Modulación de la respuesta inmune por virus <i>Viral modulation of the immune response</i> Antonio Alcamí Pertejo
58	Bases moleculares de la patogenia y del potencial anti-cáncer de los Parvovirus <i>Molecular bases of Parvovirus pathogenesis and anti-cancer potential</i> José M. Almendral del Río
60	Ecología Molecular de Ambientes Extremos <i>Molecular Ecology of Extreme Environments</i> Ricardo Amils Pibernat
62	División Celular Bacteriana y Resistencia a Antibióticos <i>Bacterial Cell Division and Antibiotics Resistance</i> Juan Alfonso Ayala Serrano
64	Bioteología y genética de bacterias termófilas extremas <i>Biotechnology and genetics of extreme thermophilic bacteria</i> José Berenguer Carlos
66	Virus de la peste porcina africana: modelos virales de evasión y protección <i>African swine fever virus: models of evasion and protection</i> Angel L. López Carrascosa
68	Morfogénesis Bacteriana <i>Bacterial morphogenesis</i> Miguel A. de Pedro Montalbán
70	Variabilidad genética de virus RNA <i>Genetic variability of RNA viruses</i> Esteban Domingo Solans
72	Bioingeniería de enzimas de levaduras para generar compuestos bioactivos <i>Yeast enzymes bioengineering to generate bioactive compounds</i> María Fernández Lobato
74	Ingeniería de Virus y Nanobioteología <i>Virus Engineering and Nanobiotechnology</i> Mauricio García Mateu
76	Efectos de elementos extracromosómicos sobre el comportamiento de su huésped <i>Bacillus</i> y mecanismos de transferencia génica horizontal en <i>Bacillus</i> <i>Effects of extrachromosomal elements on behaviour of its host and mechanisms of horizontal gene transfer in Bacillus.</i> Wilfried J.J. Meijer
78	Retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana y terapia atirretroviral <i>Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and antiretroviral therapy</i> Luis Menéndez Arias
80	Virus de la peste porcina africana <i>African swine fever virus</i> María Luisa Salas Falgueras
82	Desarrollo de nuevas estrategias para el control y prevención de enfermedades virales: el virus de la fiebre aftosa como modelo <i>New strategies for prevention and control of viral diseases: foot-and-mouth disease virus as a model</i> Francisco Sobrino
84	Estructura del mRNA y control traduccional en sistemas biológicos <i>mRNA structure and translational control in Biological Systems</i> Iván Ventoso





VIROLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA

Virology and Microbiology



Modulación de la respuesta inmune por virus

Viral modulation of the immune response



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Antonio Alcamí Pertejo

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Alberto López Bueno

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*

Abel Viejo Borbolla
Daniel Rubio Muñoz
Soledad Blanco Chapinal
Imma Montanuy Sellart
Juan Alonso Lobo
Leyre Mestre
Daniel Aguirre de Carcer

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Sergio Martín Pontejo
Nadia Martínez Martín

Carla Mavián
Haleh Heidarieh

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Rocío Martín Hernández
Carolina Sánchez Fernández
María del Carmen Fernández

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Pilar Lanuza
Laura Díaz

Científicos visitantes /
Visiting scientists:
Elena Abad
(Universidad Politécnica de
Barcelona)

Resumen de investigación

Estamos investigando mecanismos de evasión inmune utilizados por virus DNA de gran tamaño, poxvirus y herpesvirus. En concreto, estamos caracterizando proteínas virales que se secretan de la célula infectada, interaccionan con citoquinas y quimioquinas, y controlan su actividad inmunomoduladora. Trabajamos en dos sistemas virales: (1) Herpesvirus como el virus herpes simplex, un patógeno humano de relevancia clínica; y (2) Poxvirus como el virus vaccinia, la vacuna de la viruela. Estos receptores virales de citoquina s tiene propiedades inesperadas, aumentando la actividad de quimioquinas o uniéndose a la superficie celular para retenerse en los tejidos infectados, y nos dan información sobre la función de las citoquinas. La contribución de los receptores virales de citoquinas a la patogénesis y modulación inmune se está estudiando en ratones infectados con el virus ectromelia, un patógeno natural del ratón que causa una enfermedad parecida a la viruela y conocida como mousepox.

Los virus ofrecen una oportunidad única para desarrollar sus estrategias de evasión inmune, optimizadas durante millones de años de evolución, como nuevas aproximaciones terapéuticas. En colaboración con compañías biotecnológicas, estamos desarrollando proteínas inmunomoduladoras virales como potenciales medicamentos para tratar alergias y enfermedades autoinmunes humanas.

Estamos secuenciando el genoma completo de virus DNA de gran tamaño para identificar nuevos genes virales implicados en patogénesis y modulación inmune, incluyendo aislados naturales del virus ectromelia y nuevos iridovirus que infectan peces y anfibios. Los virus son las entidades biológicas más abundantes y diversas en la Tierra. Mediante aproximaciones metagenómicas, estamos caracterizando comunidades virales complejas utilizando metodologías de secuenciación de nueva generación (454-Roche, Illumina). Describimos por primera vez la comunidad de virus en un lago de la Antártida y estamos extendiendo estos estudios a otros lagos en la Península Antártica y en el Ártico. Estamos realizando estudios metagenómicos para identificar virus asociados con patologías humanas, como la esclerosis múltiple.

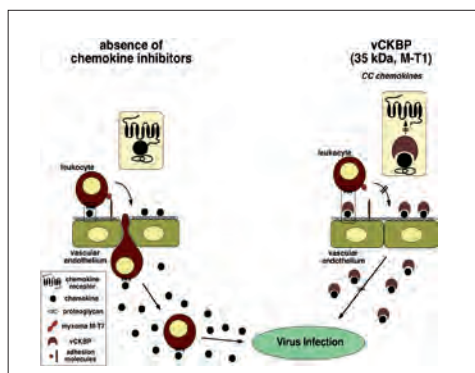


Figura 1. Proteínas de unión a quimioquinas codificadas por virus.

Figure 1. Virus-encoded chemokine binding proteins.

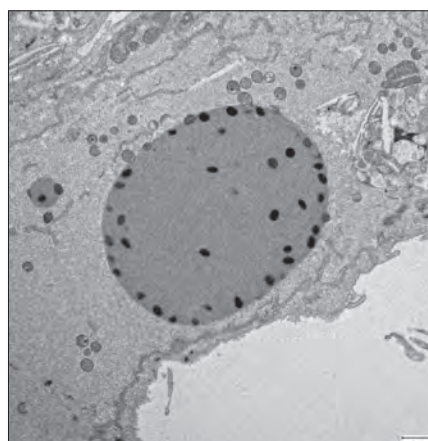


Figura 2. Micrografía electrónica de una célula infectada con el virus ectromelia mostrando un cuerpo de inclusión que contiene partículas virales maduras.

Figure 2. Electron micrograph of an ectromelia virus-infected cell showing inclusion body with mature virus particles.

Research summary

We are investigating immune evasion mechanisms employed by large DNA viruses, poxviruses and herpesviruses. Specifically, we are characterizing viral proteins that are secreted from infected cells, interact with cytokines and chemokines, and control their immunomodulatory activity. We work on two virus systems: (1) Herpesviruses like herpes simplex virus, a human pathogen of clinical relevance; and (2) Poxviruses such as vaccinia virus, the smallpox vaccine. These viral cytokine receptors have unexpected properties, enhancing the activity of chemokines or binding to the cell surface to be retained in the vicinity of infected tissues, and provide insights into the function of cytokines. The contribution of viral cytokine receptors to pathogenesis and immune modulation is being addressed in mice infected with ectromelia virus, a natural mouse pathogen that causes a smallpox-like disease known as mousepox.

Viruses offer a unique opportunity to develop their immune evasion strategies, optimized for millions of years of evolution, as novel therapeutic approaches. In collaboration with Biotech Companies, we are developing viral immunomodulatory proteins as potential medicaments to treat human allergic and autoimmune diseases.

We are sequencing the complete genome of large DNA viruses in order to identify new viral genes involved in pathogenesis and immune modulation, including natural isolates of ectromelia virus and new iridoviruses infecting fish and amphibian. Viruses are the most abundant and diverse biological entities on Earth. Following metagenomic approaches, we are characterizing complex viral communities using next generation sequencing methodologies (454-Roche, Illumina). We described for the first time the viral community in an Antarctic lake and are expanding these studies to other lakes along the Antarctic Peninsula and in the Arctic. Viral metagenomics is being used to identify viruses associated with human pathologies, such as multiple sclerosis.

Publicaciones / Publications

Alcami, A. and Moss, B. (2011) Smallpox Vaccines. In: Khan, A. S. and Smith, G. L. (eds) Scientific Review of Variola Virus Research 1999-2010. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 1-15.

Alejo, A., Pontejo, S. M., and Alcami, A. (2011) Poxviral TNFRs: properties and role in viral pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 691, 203-210.

Montanuy, I., Alejo, A., and Alcami, A. (2011) Glycosaminoglycans mediate retention of the poxvirus type I interferon binding protein at the cell surface to locally block interferon antiviral responses. *FASEB J.* 25, 1960-1971.

Xu, R., Rubio, D., Roscoe, F., Krouse, T. E., Truckenmiller, M. E., Norbury, C. C., Hudson, P. N., Damon, I. K., Alcami, A., and Sigal, L. J. (2012) Antibody inhibition of a viral type I interferon decoy receptor cures a viral disease by restoring interferon signaling in the liver. *PLoS Pathogens* 8(1):e1002475.

Viejo-Borbolla, A., Martínez-Martín, N., Nel, H. J., Rueda, P., Martín, R., Blanco, S., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., Fallon, P. G., and Alcami, A. (2012) Enhancement of chemokine function as an immunomodulatory strategy employed by human herpesviruses. *PLoS Pathogens* 8(2): e1002497.

Mavian, C., López-Bueno, A., Balseiro, A., Casais, R., Alcami, A., and Alejo, A. (2012) The genome sequence of the emerging common midwife toad virus identifies an evolutionary intermediate within ranaviruses. *J. Virol.* 86, 3617- 3625.

Mavian, C., López-Bueno, A., Fernández Somalo, M. P., Alcami, A., and Alejo, A. (2012) Complete genome sequence of the European sheafish virus. *J. Virol.* 86, 6365-6366.

Alcami, A. (2012) La comunidad de virus en la Antártida. *Revista Eidon* No. 38.

Patentes / Patents

Martín-Pontejo, S. y Alcami, A. Unión a glicosaminoglicanos de proteínas con dominio SECRET codificadas por poxvirus. Número de prioridad: P201230540. País: España. Fechas de prioridad: 11 abril 2012. Propietario: CSIC.

Cabrera, J. R., Viejo-Borbolla, A., Martínez-Martín, N., Wandosell, F. y Alcami, A.. 'Proteína viral recombinante SgG2 y/o complejos binarios SgG2-FNs para su uso en crecimiento y/o regeneración axonal'. Número de p rioridad: P201231654. País: España. Fecha de prioridad: 26 octubre 2012. Propietario: CSIC.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Sergio Martín Pontejo (2012). Características moleculares y funcionales de los receptores solubles del TNF con capacidad anti-quimioquinas de poxvirus. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Begoña Ruiz Argüello y Antonio Alcami.

Marcos Palomo (2012). Caracterización de inhibidores solubles de interferón codificados por poxvirus. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Antonio Alcami.

Nadia Martínez Martín (2012). Herpes simplex virus glycoprotein G enhances chemotaxis and axonal growth through modification of plasma membrane microdomains and receptor trafficking. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Abel Viejo Borbolla y Antonio Alcami.

Otras actividades / Other activities

Miembro del Editorial Board de Virology / Member of the Editorial Board of Virology.

Miembro de Editorial Board de Journal of Virology / Member of the Editorial Board of Journal of Virology.

Consejero del World Health Organization Advisory Committee on Variola Virus Research / Advisor to the World Health Organization Advisory Committee on Variola Virus Research.

Organizador, junto con R. Blasco y E. Villar, del XIX International Poxvirus, Asfarvirus and Iridovirus Conference. Salamanca, Junio 2012 / Organizer, together with R. Blasco and E. Villar, of the XIX International Poxvirus, Asfarvirus and Iridovirus Conference. Salamanca, June 2012.

Grupo integrante de la Red Española de Esclerosis Múltiple (www.reem.es) / The Group participates in the Spanish Network of Multiple Sclerosis (www.reem.es).

Bases moleculares de la patogenia y del potencial anti-cáncer de los Parvovirus

Molecular bases of Parvovirus pathogenesis and anti-cancer potential



Jefe de Línea / *Group Leader:*
José M. Almendral del Río

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Antonio Talavera Díez

Posdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Jon Gil-Ranado
Virginia Sardonis

Estudiantes de Posgrado /
Graduate Students:
Carlos Domínguez
Ignacio Gallardo

Leyre Garcia-Salmones
Fernando de Miguel
Olga Moreno

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Álex Ágreda
Josefa González-Nicolás

Estudiantes de Grado /
Undergraduate Students:
Jorge Sánchez
Aroa Tato

Resumen de investigación

La investigación del laboratorio está focalizada en dos temas parcialmente solapantes: (A) dinámica evolutiva en enfermedades causadas por parvovirus, y (B) interacciones virus-huésped implicadas en el oncotropismo de estos virus. Ambas estrategias están destinadas finalmente al desarrollo de herramientas biológicas anti-cáncer seguras. Nuestro modelo viral es el parvovirus diminuto del ratón (MVM) en infecciones de ratones normales e inmunodeficientes. Los principales temas que estamos abordando actualmente son: (I) Patogénesis y Evolución: las poblaciones de MVM asociadas con el desarrollo de una enfermedad hemopoyética severa en ratón se caracterizan por una elevada heterogeneidad genética localizada en el determinante de tropismo de la cápsida. Un objetivo de nuestra investigación es entender el papel de este dominio en la patogénesis viral. (II) Análisis estructura-función de la cápsida: estamos estudiando las señales de proteínas que regulan el tráfico intracelular y el ensamblaje del virión, en relación con el diseño racional de dominios que incrementen el oncotropismo viral. (III) Propiedades anti-cáncer: se está realizando un análisis amplio de las interacciones de MVM con glioblastomas humanos para intentar identificar dianas terapéuticas potenciales de cáncer involucradas en la regulación del ciclo vital de MVM.

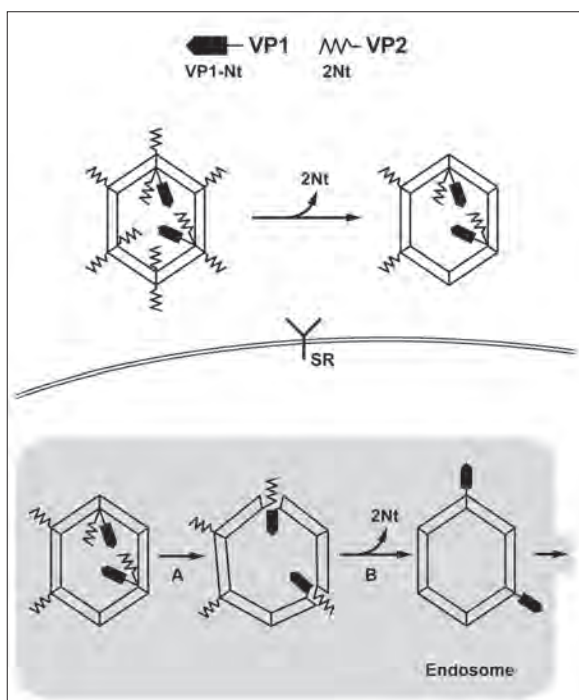


Figura 1. Funciones de los dominios N-terminal de las proteínas de la cápsida de MVM en la entrada a la célula. *Arriba:* la exposición dinámica y corte extracelular del dominio n-terminal de VP2 (2Nt) es irrelevante para la infección. *Abajo:* al pH endosomal los 2Nt restantes son expulsados aumentando el diámetro funcional del canal en el eje de orden 5. Esto facilita la exposición al exterior de la cápsida del VP1-Nt y permite al virus escapar del endosoma.

Figure 1. Functions of the unordered N-terminal domains of MVM capsid proteins in cell entry. *Upper:* the extracellular dynamic exposure and cleavage of VP2 n-terminal domain (2Nt) is irrelevant for the infection. *Lower:* at the endosomal pH most remaining 2Nt are extruded enlarging the functional diameter of the 5-fold channel. This facilitates the externalization out of the capsid of the VP1-Nt and suffices the virus to escape from the endosome.

Research summary

The research of the laboratory is focused in two partly overlapping issues: (A) the evolutionary dynamics of parvovirus in disease, and (B) the cell-host interactions underlying the oncotropism of these viruses. Both approaches are aimed at eventually designing safe anti-cancer biological tools. Our viral model is the parvovirus Minute Virus of Mice (MVM) in infections of normal and immunodeficient mice. Main specific topics being currently addressed are: (I) Pathogenesis and evolution: MVM populations associated with the development of a severe mouse hemopoietic disease are characterized by a high genetic heterogeneity localized at the capsid tropism determinant. Understanding the role of this domain in viral pathogenesis is a main target of our research. (II) Structure-Function analysis of the capsid: we are studying protein signals regulating the intracellular traffic and assembly of the virion relating to the rational design of domains increasing viral oncotropism. (III) Anti-cancer features: we are undertaking a wide analysis of MVM interaction with human glioblastomas trying to identify potential cancer therapeutic targets involved in the regulation of MVM life cycle.

Publicaciones / Publications

Rommelaere, J., Almendral, J.M., Cornelis, J., and Nuesbch, J. (2011) Parvovirus. In: *The Springer Index of Viruses* (ed. A. Tidona & G. Darai), pp 713-722. Springer (Heidelberg, Germany).

Tijssen, P., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., Bergoin, M., Flegel, T.W., Hedman, H., Kleinschmidt, J., Li, Y., Pintel, D.J., and Tattersall, P. (2011) Family Parvoviridae. In: *ICTV Report 2011* (ed by A. M.Q. King, M.J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz), pp 405-425, Elsevier (Oxford, UK).

Gil-Ranedo, J., Mendiburu-Elicabe, M., Garcia-Villanueva, M., Medina, D., Del Alamo, M., and Izquierdo, M. (2011). An Off-Target Nucleostemin RNAi Inhibits Growth in Human Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells. *PLoS One* 6, e28753.

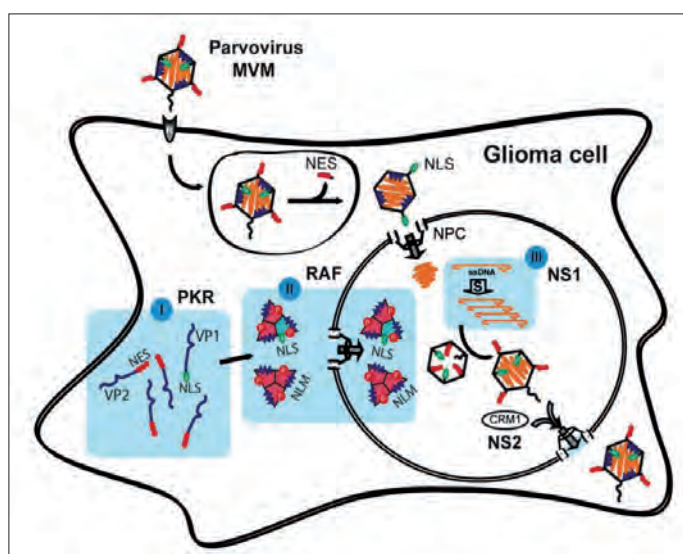
Gil-Ranedo, J., Mendiburu, M., Izquierdo, M., and Almendral, J.M. (2012). Glioma-Parvovirus interactions: molecular insights and therapeutic potential. In: *Glioma* (ed. by F. Farassati) pp. 143-161, InTech-Open Access Publisher (Rijeka, Croatia).

Banan, M., Bayat, H., Azarkeivan, A., Mohammadparast, S., Kamali, K., Farashi, S., Bayat, N., Khani, M., Neishabury, M., and Najmabadi, H. (2012) The XmnI and BCL11A single nucleotide polymorphisms may help predict hydroxyurea response in Iranian β -thalassemia patients. *Hemoglobin* 36, 371-380.

Sánchez-Martínez, C., Grueso, E., Carroll, M., Rommelaere, J., and Almendral, J. M.. (2012). Essential role of the unordered VP2 n-terminal domain of the parvovirus MVM capsid in nuclear assembly and endosomal enlargement of the virion fivefold channel for cell entry. *Virology* 432, 45-56.

Figura 2. Visión global del ciclo vital del Parvovirus MVM en células de glioma. *Entrada:* el corte de VP2 y las actividades fosfolipasa y NLS de la VP1 son necesarias para entregar el genoma a través del CPN. *Ensamblaje de la cápsida:* La fosforilación y ensamblaje en trímeros de las VP conduce a su translocación al interior del núcleo. *Maduración y salida:* el ADN viral se amplifica en la fase S y se empaqueta en cápsidas vacías. Los viriones llenos de ADN salen activamente del núcleo. Se destacan los factores celulares y dominios de proteínas virales principales involucrados en las interacciones.

Figure 2. Overview of Parvovirus MVM life cycle in glioma cells. *Entry:* VP2 cleavage, and the Phospholipase and NLS activities of VP1 are required to deliver the genome across the NPC. *Capsid Assembly:* VP phosphorylation and assembly into trimers lead to translocation into the nucleus. *Maturation and Egress:* Viral DNA is amplified in the S phase and packaged into empty capsids. DNA-filled virions actively egress from the nucleus. Cellular factors and main viral protein domains found involved in the interactions are highlighted.



Ecología Molecular de Ambientes Extremos

Molecular Ecology of Extreme Environments



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Ricardo Amils Pibernat

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Aldo González Becerra

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Moustafa Malki
Monika Oggerin de Orube
Enoma Omoreggie (Marie Curie)
Cristina Moraru (Marie Curie)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Patxi San Martín Uriz
Enrique Marín Palma
Carlotta Vizioli
Irene Sánchez Andrea
Kary Giannina Haro Pérez

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Nuria Rodríguez González

Catalina del Moral Juárez
Diego Carrillo

Estudiantes / *Undergraduate Students:*

Juan Ramón Díaz
Sara González
Sara Marco
Alejandro Palomo
Laura Sanguino
Guillermo Mendoza
Virginia Mandujano (UPP, México)
Omar A. Hernández (U. de Toluca, México)

Centíficos Visitantes / *Visiting Scientists*
Alberto González Fairen (NASA-Ames, USA)
Eric Zettler (MBL, Woods Hole, USA)
Ainhua Arana Cuenca (UPP, México)
Alejandro Tellez Jurado (UPP, México)
Oswaldo Guzmán López (UAMI, México)

Resumen de investigación

Ecología Molecular de Ambientes Extremos: Esta área de investigación persigue los siguientes objetivos:

Acidófilos: ecología microbiana convencional, ecología molecular, biología molecular y biotecnología (biolixiviación, secuestro específico de metales y fitorremediación) de ambientes ácidos extremos (la cuenca del Río Tinto, actividades mineras de la Faja Pirítica Ibérica, río Agrio (Argentina) y la Antártida).

- Caracterización geomicrobiológica de ambientes extremos como modelos de habitabilidad: la cuenca del Tinto (análogo de Marte), depósitos de sulfuros metálicos de la Antártida (análogo de Marte), la laguna hipersalina de Tirez (análogo de Europa) en colaboración con la profesora I. Marín (UAM), el salar de Uyuni (análogo de Europa) en colaboración con la profesora I. Marín, y zonas de permafrost de Alaska (análogos de Marte).

- Geomicrobiología del subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica (IPB): caracterización del bio-reactor subterráneo en la IPB responsable de las condiciones extremas del Río Tinto. Este trabajo se está desarrollando en colaboración con el Centro de Astrobiología (Proyecto ERC IPBSL).

- La línea de ecología microbiana de ambientes anaerobios, dirigida por el profesor J.L. Sanz (UAM), se está desarrollando en los laboratorios que el Departamento de Biología Molecular tienen en el edificio de Biología. Este trabajo está centrado en la caracterización de las actividades anaerobias en los distintos modelos de estudio del grupo de investigación (cuenca del Tinto, subsuelo de la IPB).

Micología. Esta área de investigación está dirigida por el Dr. Aldo González y tiene los siguientes objetivos:

- Genética molecular y microbiología de Basidiomicetos (*Pleurotus ostreatus* como sistema modelo de estudio).

- Uso de hongos filamentosos como fuente de metabolitos secundarios, enzimas lignolíticas y para secuestro específico de metales.

- Control y eliminación de hongos de aire de interior.

- Transcriptómica y proteómica para el estudio del secretoma.



Figura 1. Obtención de muestras del subsuelo en condiciones anaerobias.

Figure 1. Isolation of subsurface samples under anaerobic conditions.

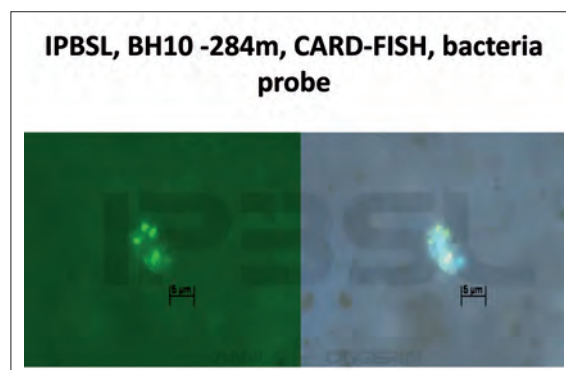


Figura 2. CARD-FISH en una muestra de -284m de profundidad.

Figure 2. CARD-FISH in a 284 m deep subsurface sample.

Research summary

Molecular Ecology of Extreme Environments: This area of research has the following objectives:

- Acidophiles: conventional microbial ecology, molecular ecology, molecular biology and biotechnology (bioleaching, specific metal sequestering and phytoremediation) of extreme acidic environments (Río Tinto basin, different mine sites of the Iberian Pyritic Belt, río Agrio (Argentina), Antartica),
- Geomicrobiological characterization of extreme environments as habitability models: Tinto basin (Mars analogue), sulfide deposits from Antartica (Mars analogue), Tirez hypersaline lagoon and Uyuni salt lake (Europa analogues), both in collaboration with professor I. Marín (UAM), permafrost areas of Alaska (Mars analogue).
- Geomicrobiology of the Iberian Pyritic Belt (IPB) subsurface: characterization of the subsurface bioreactor responsible of the extreme acidic conditions of Río Tinto. This work is done in collaboration with the Centro de Astrobiología (ERC Project IPBSL)
- The line of microbial ecology of anaerobic environments directed by professor J.L. Sanz (UAM) is being developed in the facilities that the Department of Molecular Biology has in the Biology Building. This collaborative work is centred in the anaerobic activities detected in the different model systems studied by our group (Tinto basin, subsurface of the IPB).

Micology. This area of research directed by Dr. Aldo González has the following objectives:

- Molecular genetics and microbiology of Basidiomycetes (*Pleurotus ostreatus* as model system).
- Use as filamentous fungi as a source of secondary metabolites, lignolytic enzymes and specific sequestering of toxic metals.
- Control and elimination of fungi from air-indoor.
- Transcriptomics and proteomics for the study of the secretome .

Publicaciones / Publications

Sánchez-Román, M., Romanek, C.S., Fernández-Remolar, D., Sánchez-Navas, A., McKenzie, J.A., Amils, R., and Vasconcelos, C. (2011) *Chemical Geology*, **281** :143-150. doi:10.1016/j.chemgeo.2010.11.020.

Fernández-Remolar, D., Prieto-Ballesteros, O., Gómez-Ortiz, D., Fernández-Sampedro, M., Sarrazin, P., Gailhanou, M., and Amils, R. (2011) *Icarus*, **211**: 114-138.

González-Toril, E., Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., López Pamo, E., Sánchez-Espada, J., and Amils, R. (2011) *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**: 2685-2694.

Souza-Egipsy, V., Altamirano, M., Amils, R., and Aguilera, A. (2011) *Environ. Microbiol.*, **13**(8): 2351-2358, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02506.x.

García-Muñoz, J., Amils, R., Fernández, V.M., De Lacey, A., and Malki, M. (2011) *Internat. Microbiol.*, **14**: 73-81.

Sanz, J.L., Rodríguez, N., Díaz, E., and Amils, R. (2011) *Environ Microbiol.*, **13**(8): 2336-2341, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02504.x.

Fairen, A.G., Dohm, J.M., Baker, V.R., Thompson, S.D., Mahaney, W.C., Herkenhoff, E., Rodríguez, A.P., Dávila, A.F., Schulze-Makuch, E., Mari, R., Uceda, E.R., Amils, R., Miyamoto, H., Kim, K.J., Anderson, R.C., and McKay, C.P. (2011) *Meteoritics & Planet. Sci.*, **46**: 1832-1841. doi: 10.1111/j.1945-5100.2011.01297.x.

Sánchez-Andrea, I., Rodríguez, N., Amils, R., and Sanz, J.L. (2011) *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**: 6085-6093.

San Martín-Uriz, P., Gómez, M.J., Arcas, A., Bargiela, R., and Amils, R. (2011) *J. Bacteriol.*, **193**: 5585-5586. doi: 10.1128/JB.05386-11.

Zuluaga, J., Rodríguez, N., Rivas-Ramírez, I., de la Fuente, V., Rufo, L., and Amils, R. (2011) *Biol. Trace Elem. Res.*, **144**: 1302-1317. DOI: 10.1007/s12011-011-9140-8.

Montoya, L., Lozada-Chavez, I., Amils, R., Rodríguez, N., and Marín, I. (2011) *Int. J. Microbiol.*, article ID 753758, doi: 10.1155/2011/753758.

Gómez, F., Walter, N., Amils, R., Rull, F., Klingelhöfer, AK, Kvidero, J., Sarrazin, P., Foing, B., Behar, A., Fleischer, I., Parro, V., García-Villadangos, M., Blake, D., Martín Ramos, JD, Direito, S., Mahapatra, P., Stam, C., Venkateswaran, K., and Voytek, M. (2011) *Internat. J. Astrobiol.*, **10**(3): 291-305, doi:10.1017/S147355041100005X.

Sánchez, M., Muñoz, M., Amils, R., and Sánchez, B. (2011) *Analytical Methods*, **3**: 303-314. DOI: 10.1039/c1ay05562c.

Fernández-Remolar, D.C., Sánchez-Román, M., Hill, A.C., Gómez-Ortiz, D., Prieto Ballesteros, O., Romanek, C.S., and Amils, R. (2011) *Meteoritics & Planetary Science*, **46**: 1447-1469.

Gómez, F., Prieto-Ballesteros, O., Fernández-Remolar, D., Rodríguez-Manfredi, J.A., Fernández-Sampedro, M., Postigo, M., Torres, J., Gómez-Elvira, J., Amils, R., and Rodríguez, N. (2011) *Advances in Astronomy*, doi:10.1155/2011/953936.

Köchling, T., Lara-Martín, P., González-Mazo, E., Amils, R., and Sanz, J.L. (2011) *Int. Microbiol.*, **14**: 143-134. DOI: 10.2436/20.1501.01.XXX.

Colín-García M., Kanawati B., Harir M., Schmitt-Kopplin P., Amils R., Parro V., García M. and Fernández-Remolar D (2011) *Orig Life Evol Biosph.* **41**(6): 523-527. doi: 10.1007/s11084-011-9258-x.

Gómez, F., Rodríguez-Manfredi, J.A., Rodríguez, N., Fernández-Sampedro, Caballero-Castrejón, F.J., and Amils R. (2012). *Planet. Space Sci.*, **14**:143-154. doi:10.1016/j.pss.2011.12.021.

de la Fuente, V., Rodríguez, N., and Amils, R. (2012) *Acta Histochem.*, **114**: 232-236. doi: 10.1016/j.acthis.2011.06.007.

Bühning, S.J., Schubotz, F., Harms, C., Lipp, J.S., Amils, R., and Hinrichs, K.U. (2012) *Organic Geochemistry*, **47**: 66-77.

García-Moyano, A., González-Toril, E., Aguilera, A., and Amils, R. (2012) *FEMS Microbiol. Ecol.*, **81**: 303-314.

Sánchez-Andrea, I., Rojas-Ojeda, P., Amils, R., and Sanz, J.L. (2012) *Extremophiles*, **16**: 829-839.

Sánchez-Andrea, I., Knittel, K., Amann, R., Amils, R., and Sanz, J.L. (2012) *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**: 4638-4645, doi: 10.1128/AEM.00848-12.

Sánchez, B., Sánchez-Muñoz, M., Muñoz-Vicente, M., Cobas, G., Portela, R., Suárez, S., González, A.E., Rodríguez, N., and Amils, R. (2012) *Chemosphere*, **87**: 625-630, doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.050.

Fernández-Remolar, D., Preston, L.J., Sánchez-Román, M., Izawa, M.R.M., Huang, L., Southam, G., Banerjee, N.R., Osinski, G.R., Flemming, R., Gómez-Ortiz, D., Prieto-Ballesteros, O., Rodríguez, N., Amils, R., and Dyar, M.D. (2012) *Earth Planet. Sci. Lett.*, **351**: 13-26.

CAPITULOS DE LIBRO: Cuatro capítulos de libro en *Ecologie Microbienne, Advances in Applied Microbiology, Gel Electrophoresis y Artificial Photosynthesis*.

Otras actividades / Other activities

Editor de Encyclopedia of Astrobiology, Springer, 2011.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Irene Sánchez-Andrea (2012). Diversidad microbiana de los sedimentos anaerobios del Río Tinto. Universidad Autónoma de Madrid, José Luis Sanz y Ricardo Amils.

División Celular Bacteriana y Resistencia a Antibióticos

Bacterial Cell Division and Antibiotics Resistance

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Juan Alfonso Ayala Serrano

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Silvia Marina González Leiza

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Cristian Gustavo Aguilera Rossi
Alaa Ropy Mahmoud Sayed
Sandra Liliana Sarmiento Benavides

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Bárbara Lafuente Campo
Ali Ellafi

Científicos visitantes /
Visiting Scientist:

Ayelen Patricia Porto (FSO) (Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina)
Beatriz Tamargo (UAM-UH, Universidad de La Habana, Cuba)
José di Conza (CONICET) (Universidad Nacional del Litoral, Argentina)

Resumen de investigación

Las bacterias están protegidas contra los cambios medioambientales por una pared celular externa, polímero de peptidoglicano llamado sáculo. La integridad del sáculo es esencial para la viabilidad bacteriana y la morfogénesis. Debido a esta esencialidad y exclusividad para la célula bacteriana, las enzimas implicadas en su metabolismo (PBPs, transglucosilasas, transpeptidasas, racemasas, carboxipeptidasas, etc) se han convertido en objetivos preferentes para el desarrollo de antibióticos.

Contrariamente a las ideas tradicionales, investigaciones recientes muestran que la pared celular es una estructura muy variable y dinámica. Nuestro grupo demostró la inducción de cambios estructurales en el sáculo en respuesta al desafío con antibióticos como un paso clave para activar mecanismos de defensa. Además, los metabolitos secundarios bacterianos secretados como moléculas efectoras en la señalización intercelular son una fuente importante de los cambios adaptativos en las paredes celulares bacterianas. Nuestra investigación actual apunta a mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a los cambios adaptativos exhibidos por la pared celular en respuesta a los antibióticos y otros cambios ambientales. Para ello, estamos estudiando la enzimología del peptidoglicano en respuesta a condiciones de estrés, la regulación de factores de resistencia a beta-lactámicos, y la identificación de las señales extra / intra-celulares que provocan estas respuestas. Se hace especial hincapié en la investigación de PBPs de bajo peso molecular y sistemas de expresión inducibles de beta-lactamasas como sensores de daño de la pared celular. Los resultados deberían conducir al descubrimiento de nuevas vías en el metabolismo de la pared celular, proporcionando una visión mas real de la diversidad de peptidoglicano en la naturaleza. Los resultados de estos estudios serán de ayuda sustancial para comprender mejor cuestiones fundamentales sobre la capacidad de adaptación del peptidoglicano frente a los retos medioambientales. Se trata de un proyecto ambicioso que depende de manera significativa en las relaciones de colaboración con un importante número de laboratorios nacionales y extranjeros, y está previsto para promover un serio esfuerzo interdisciplinario incluyendo áreas tan diversas como microbiología, cristalografía, química y bio-informática.

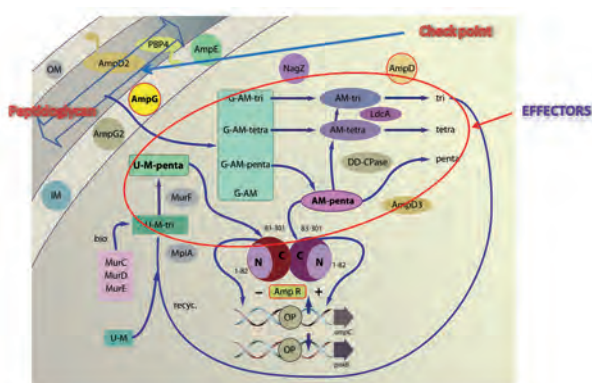


Figura 1. Visión global de los mecanismos de inducción de beta-lactamasa en *Pseudomonas*. La inhibición de las PBPs por β -lactámicos provoca un aumento en la concentración de putativas moléculas efectoras derivadas del metabolismo del peptidoglicano. La presencia de estos efectores es utilizada por la célula como un mecanismo de punto de control de la situación real de la pared celular. Estos efectores entran en la célula por una permeasa específica (AmpG en el diagrama) y otras enzimas auxiliares. También, varias enzimas en el citoplasma (NagZ, AmpD, LdcA, DD-CPase) son capaces de modificar los efectores iniciales. El efecto final de este proceso es reclutar AmpR sobre el promotor y activar la transcripción del regulón. Uno de los genes conocidos del regulón AmpR codifica para AmpC, que hidroliza directamente al β -lactámico, ayudando a prevenir un mayor daño del peptidoglicano. El regulón AmpR se sabe que también incluye otros genes que no codifican β -lactamasas, y se propone que sus productos tienen un papel en la protección de la célula del desafío de los β -lactámicos a través de un mecanismo auxiliar.

Figure 1. General outlook about the mechanisms of betalactamase induction in *Pseudomonas*. Inhibition of PBPs by β -lactams causes an increase in the concentration of putative effectors molecules derived from peptidoglycan metabolism. Presence of these effectors is use by the cell as a checkpoint mechanism of the actual state of the cell wall. These effectors enter the cell by a specific permease (AmpG in the diagram) and other helper enzymes. Also, several enzymes in the cytoplasm (NagZ, AmpD, LdcA, DD-CPase) are able to modify those initial effectors. The final effect of this is to recruit AmpR and activate regulon transcription. Known AmpR regulon genes encode AmpC, which directly hydrolyses the β -lactam, helping to prevent further peptidoglycan damage. The AmpR regulon is also known to include non- β -lactamase-encoding genes, and it is proposed that their products have a role in protecting the cell from β -lactam challenge through an ancillary mechanism.

Research summary

Bacteria are protected from environmental offenses by an external cell wall. This structure consists of a strong yet elastic peptidoglycan polymer called the murein sacculus. Integrity of the sacculus is essential for bacterial viability and morphogenesis. Because the sacculus is both essential and exclusive for the bacterial cell, the enzymes involved in peptidoglycan metabolism (PBPs (penicillin-binding proteins), transglycosylases, transpeptidases, racemases, carboxypeptidases, etc) have become preferred targets for antibiotic development.

Contrary to traditional ideas, recent investigations showed that the cell wall is a highly variable and dynamic structure. Previous research from our group demonstrated the induction of structural changes in the sacculus in response to antibiotic challenge as a key step to trigger defense mechanisms. Furthermore, bacterial secondary metabolites secreted as effectors molecules in intercellular signaling are a previously unrecognized important source of adaptive changes in bacterial cell walls. All these advancements mean that traditional ideas on peptidoglycan metabolism need to be deeply revisited and reassessed pondering the ecological niches of microorganisms. Our current investigation aims to improve our understanding of the molecular mechanisms underlying the adaptive changes exhibited by the cell wall in response to antibiotics and other environmental challenges. To do so, we will study peptidoglycan enzymology in response to stress conditions, regulation of beta-lactam resistance factors, and identification of the extra/intra-cellular signals that trigger these responses. Particular emphasis will be made on the research of low molecular weight PBPs and inducible beta-lactamase systems as sensors of cell wall damage. The results should lead to the discovery of new pathways in the cell wall metabolism, which should provide a closer to real vision of peptidoglycan diversity in nature. The results from these studies will be of substantial help to better understand fundamental questions about bacterial social behavior in poly-microbial communities and adaptability against environmental challenges. This project relies significantly in collaborative relations with an important number of domestic and foreign laboratories, and is planned to promote a serious inter disciplinary effort including expertise areas as diverse as microbiology, crystallography, chemistry and bio-informatics.

Publicaciones / Publications

Ayala, J. A., Cava, F., and M. A. de Pedro. (2012) Cell Wall Stress-sensing Regulatory Systems in Gram-negative Bacteria in "Stress Response in Microbiology" Requena J. M. (ed.) First Edition. ISBN: 978-1-908230-04-1. Horizon Scientific Press, Norwich, UK, 436 pp.

Tamargo B., L. A. Rosario, N. Batista, D. F. Arencibia, K. Fernández, A. Villegas, J. A. Ayala, V. G. Sierra. (2012) Protección inducida por nanococleatos derivados de proteoliposomas de *Leptospira interrogans* serovar Canicola. *Vacuum Monitor* **21**(1), 3-9.

Di Conza J.A., Mollerach M.E., Gutkind G.O., and Ayala J.A. (2012) Two multidrug-resistant *Salmonella infantis* isolates behave like hypo-invasive strains but have high intracellular proliferation. *Rev Argent Microbiol.* **44**(2), 69-74.

M. Lorenzo, N. García, J. A. Ayala, S. Vadillo, S. Píriz, and A. Quesada. (2012) Antimicrobial resistance determinants among anaerobic bacteria isolated from foot rot. *Vet. Microbiol.* **157**(1-2), 112-118.

Bado I., V. García-Fulgueiras, N. Cordeiro, L. Betancor, L. Caiata, V. Seija, L. Robino, G. Algorta, A. Chabalgoity, J. A. Ayala, G. Gutkind, and R. Vignoli. (2012). First human isolate in South America of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harbouring blaCTX-M-14. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**(4), 2132-2134.

A. Fernandez, A. Perez, J. A. Ayala, S. Mallo, S. Rumbo, M. Tomas, M. Poza, and G. Bou. (2012) Expression of OXA-type and SFO-1 β -lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**(4), 1877-1884.

S. M. González-Leiza, M. A. de Pedro, and J. A. Ayala. (2011) AmpH, a bifunctional DD-endopeptidase and DD-carboxypeptidase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **193**(24), 6887-6894.

J. Sóki, S. M. Gonzalez, E. Urbán, E. Nagy, and J. A. Ayala. (2011) Molecular analysis of the effector mechanisms of cephamycin resistance among *Bacteroides* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**(11), 2492-2500.

L. C. Lozano, J. A. Ayala, and J. Dussán. (2011) *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. *Biotechnology Letters*, **33**(10), 2037-2041.

E. Vishnyakov, S. A. Levitskii, V. N. Lazarev, V.A. Manuvera, J. A. Ayala, V. A. Ivanov, E. S. Snigirevskaya, Y. Y. Komissarchik, and S. N. Borchsenius. (2011) The identification and characterization of IbpA, a novel α -crystallin type heat shock protein from *Mycoplasma*. *Cell Stress & Chaperones*. **17**(2), 171-180.

R. Cayô, M.C. Rodríguez, P. Espinal, F. Fernández-Cuenca, A. A. Ocampo-Sosa, A. Pascual, J. A. Ayala, J. Vila and L. Martínez-Martínez (2011). Analysis of Genes Encoding for Penicillin-Binding Proteins in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**(12), 5907-5913.

García-Fulgueiras V., I. Bado, I. Mota, L. Robino, N. F. Cordeiro, A. Varela, G. Algorta, G. Gutkind, J. A. Ayala, and R. Vignoli. (2011). Extended spectrum β -lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the Paediatric Hospital of Uruguay. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**(8), 1725-1729.

D. Marcos-Martínez, M. Del Valle, J.A. Ayala, F. J. Manuel de Villena, and J.O. Cáceres (2011) Identification and Discrimination of Bacterial Strains by Laser Induced Breakdown Spectroscopy and Neural Networks. *Talanta*, **84**(3), 730-737.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Lozano Ardila, Lucia Cristina (2012). *Lysinibacillus sphaericus* heavy metal tolerance and mosquito biological control: from function to genome. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia. Director (Advisor): Jenny Dussán Profesor Asociado, Universidad de los Andes. Codirector (Coadvisor): Juan Alfonso Ayala, Profesor Honorario, Universidad Autónoma de Madrid.

Biotecnología y genética de bacterias termófilas extremas

Biotechnology and genetics of extreme thermophilic bacteria



Jefe de Línea / Group Leader:

José Berenguer Carlos

Personal Científico / Scientific Staff:

Aurelio Hidalgo Huertas

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:

Carolina Elvira César

Leticia Luciana Torres

Eloy Roberto Ferreras Puente

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Laura Alvarez Muñoz

Carlos Bricio Graberí

Marcos Almendros Giménez

Noé Rigoberto Rivera

Yamal Al-Ramahi González

Alba Blesa Esteban

Martin Hesseler

Ángel Cantero Camacho

Tania Parra Alonso

Estudiantes / Undergraduate Students:

Akbar Espallat Fernández

Joan Salvador Russo

Daniël Christianus Swarts

Lara Pérez Sánchez

Manuel San Martín Fernández de

Heredia

Jorge Pérez Pastor

Técnicos de Investigación /

Technical Assistance:

Esther Sánchez Freire

María Luisa del Pozo Polo

María José de Soto López

Científicos Visitantes / Visiting Scientists:

Juan Pablo Fuciños González

Roberto González González

Resumen de investigación

En nuestro laboratorio estudiamos (1) el metabolismo anaerobio de bacterias termófilas extremas, (2) su transferencia horizontal, y (3) desarrollamos aplicaciones biotecnológicas derivadas de su utilización o de la de sus enzimas. Como modelo principal utilizamos la bacteria termófila extrema *Thermus thermophilus* (*Tth*) por ser excepcionalmente manipulable en comparación con otros termófilos extremos. Su filogenia ancestral y la estabilidad de sus componentes hacen de *Tth* uno de los modelos favoritos tanto en Biología Evolutiva como en Biología Estructural.

En los últimos dos años hemos centrado nuestros esfuerzos en el análisis de las enzimas implicadas en los pasos finales de la desnitrificación y en su transferencia horizontal (LGT). Hemos caracterizado la nitrito y la óxido nítrico reductasas codificadas en un agrupamiento génico susceptible de LGT, pero de expresión dependiente del agrupamiento para la respiración de nitrato. Hemos empezado también a estudiar los mecanismos de LGT de ambos agrupamientos, identificando como vía principal el contacto directo célula-célula que, sin embargo, no implica homólogos de proteínas propias de sistemas de conjugación clásicos. También hemos iniciado estudios sobre las barreras que protegen a estas bacterias frente a la entrada de DNA exógeno empleando interferencia mediada por guías de ácidos nucleicos.

En la línea más aplicada, nuestros esfuerzos se han concentrado principalmente en dos aspectos. Por un lado, hemos procedido a la selección de variantes termoestables de proteínas mediante la utilización de técnicas de interferencia de plegamiento (ej. Esterasa I de *P. fluorescens*), o diseño racional (ej. proteínas fluorescentes). Por otro, hemos caracterizado y utilizado varias enzimas termoestables de interés biotecnológico, tales como una penicilina acilasa o tres nucleósido fosforilasas.

En los próximos años profundizaremos en los mecanismos de LGT y las barreras frente a éstos, e iniciaremos un proyecto para la identificación y selección in vitro de enzimas termoestables mediante nuevos sistemas de generación de señal.

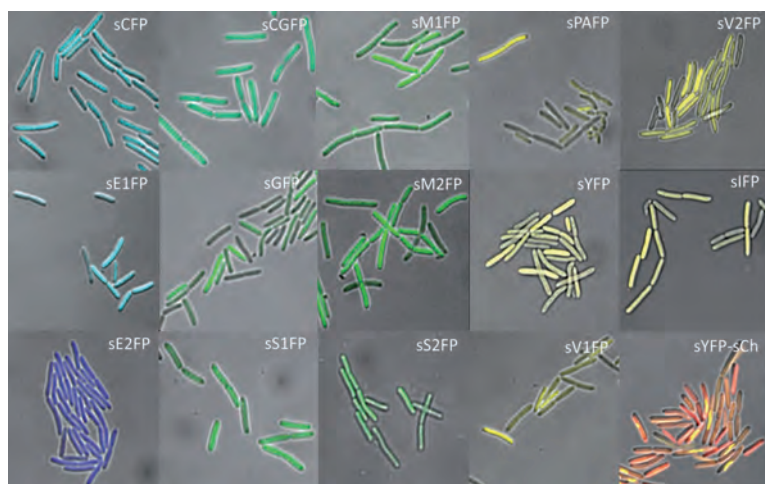


Figura 1. Variantes termoestables de proteínas fluorescentes de distintos colores expresadas a 70 °C en *Thermus thermophilus*. Se muestra la superposición de fluorescencia y contraste de fases.

Figure 1. Thermostable color variants of fluorescent proteins expressed at 70°C in *Thermus thermophilus*. Images correspond to merging of fluorescence and phase contrast channels.

Research summary

In our laboratory we study i) the anaerobic metabolism of extreme thermophilic bacteria, ii) the lateral gene transfer (LGT) of the corresponding genes, and iii) we develop biotechnological applications derived from their use or from that of their enzymes. As main lab model we use the extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* (Tth) for being exceptionally easy to growth and manipulate compared to most extreme thermophiles. Its ancient phylogeny and the thermal stability of its cellular components and complexes make Tth one of the favorite models for both, Evolutionary and Structural Biology programs.

In the last two years we have focused on the analysis of the enzymes involved in the final steps of denitrification. We characterized the nitrite and the nitric oxide reductases, encoded within a gene cluster susceptible of LGT, but whose expression depends on the nitrate respiration gene cluster. Regarding the LGT mechanisms of the denitrification genes, we have identified a cell-to-cell transfer that involves no homologues to proteins from classical conjugation systems. We have also started the studies on the barriers that protect Tth from invading DNA, especially on those that involve nucleic acid-based interference mechanisms.

In more applied grounds, our efforts have focused mainly on two aspects. On one side, we have selected thermostable variants of proteins using either folding interference techniques in Tth (i.e. *Pseudomonas fluorescens* esterase I) or rational design (i.e. thermostable fluorescent proteins). In addition, we have overexpressed, purified and characterized highly thermostable enzymes of biotechnological interest, such as a penicillin acylase or nucleoside phosphorylases.

In the next years we will continue our studies on the mechanisms of LGT and its barriers, and will start a large-scale project aimed to the identification and isolation in vitro of thermostable enzymes through a recently developed new signal generation system.

Publicaciones / Publications

Alvarez L., Bricio C., Gómez, M. J., and Berenguer, J. (2011) Lateral transfer of the denitrification pathway among *Thermus thermophilus* strains. *Appl Env. Microbiol* **77**, 1352-1358.

Alvarez, L., Bricio, C., Chahlaflí, Z., Cava, F., Hidalgo, A., and Berenguer, J. (2011) Regulación y transferencia horizontal de la desnitrificación en *Thermus* sp. In I.S.B.N. 978-84-8454-806-5. Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain, pp. 173-186

Bolívar, J. M., Hidalgo, A., Sánchez-Ruiloba, L., Berenguer, J., Guisán, J. M., and López-Gallego, F. (2011). *J. Biotech* **155**, 412-420

Bricio, C., Alvarez, L., Gómez, M. J., and Berenguer J. (2011) Partial and complete denitrification in *Thermus thermophilus*: lessons from genome drafts. *Biochem Soc Trans* **39**:249-253.

César, C. E., Alvarez, L., Bricio, C., van Heerden, E., Littauer D. and Berenguer J. (2011) Unconventional lateral gene transfer in extreme thermophilic bacteria. *Int Microbiol* **14**,187-199.

Rocha-Martín, J., Vega, D., Bolívar J. M., Godoy, C. A., Hidalgo, A., Berenguer, J., Guisán J. M., and López-Gallego, F. (2011). *BMC Biotechnology* **11**, 101-112

Gounder, K., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Wolherr, A., Daniel, R., Gottschalk, G., Reva, O., Kummwenda, B., Srivastava, M., Berenguer, J., Bricio, C., van Heerden, E., Litthauer, D. (2011). *BMC Genomics* **12**: 577-591.

Hesseler, M., Bogdanović, X., Hidalgo, A., Berenguer, J., Palm, G. J., Hinrichs, W., Bornscheuer, W. T. (2011). *Appl Microb Biotech* **91**, 1049-1060.

Acosta, F., Alvarez, L., de Pedro, M. A., and Berenguer, J. (2012) Localized synthesis of the outer envelope from *Thermus thermophilus*. *Extremophiles* **16**, 267-275.

Costa, H., Distéfano, A. J., Marino-Buslje, C., Hidalgo, A., Berenguer, J., Biscoglio de Jiménez Bonino, M., and Ferrarotti, S. A. (2012). *Appl Microbiol Biotechnol*. **94**, 123-130.

Acosta, F., de Pedro, M. A., and Berenguer J. (2012) Homogeneous incorporation of secondary cell wall polysaccharides to the cell wall of *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* **16**, 485-495.

Almendros, M., Berenguer, J.*, and Sinisterra, J. V. (2012) *Thermus thermophilus* nucleoside phosphorylases active in the synthesis of nucleoside analogues. *Appl Environ Microbiol* **78**, 3128-3135.

Rocha-Martín, J., Vega, D., Bolívar, J. M., Hidalgo, A., Berenguer, J., Guisán, J. M., López-Gallego, F. (2012). *Bioresour Technol* **103**, 343-50.

Sandoval, M., Ferreras, E. R., Pérez-Sánchez, M., Berenguer, J., Sinisterra, J. V. and Hernaiz, M.J.. (2012). *J Mol Catal B, Enzymatic* **74**, 162-169

Acosta, F., Ferreras, E. R., and Berenguer, J. (2012) The beta-barrel assembly machinery (BAM) is required for the assembly of a primitive S-layer protein in the ancient outer membrane of *Thermus thermophilus*. *Extremophiles* **16**, 853-861.

Sandoval, M., Civera, C., Treviño, J., Ferreras, E., Cortés, A., Vautier, M., Berenguer, J., Lozano, P., and Hernaiz, M. J. (2012). *RSC Advances* **2**, 6306-6314

Torres, L. L., Ferreras, E. R., Cantero, A., Hidalgo, A., and Berenguer, J. (2012) Functional expression of a penicillin acylase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB27 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories* **w**, 105 -117.

Torres, L. L., Schliessmann, A., Schmidt, M., Silva-Martin, N., Hermoso, J. A., Berenguer, J., Bornscheuer, U. T., and Hidalgo, A. (2012) Promiscuous enantioselective (-)- γ -lactamase activity in the *Pseudomonas fluorescens* esterase I. *Org Biomol Chem*. **10**, 3388-3392.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Carlos Bricio Garberí (2012) Reducción de óxidos de nitrógeno gaseosos en *Thermus thermophilus*. Universidad Autónoma de Madrid (mención europea). Director: José Berenguer.

Laura Alvarez Muñoz (2012) Análisis de la respiración de nitrito en *Thermus thermophilus*. Universidad Autónoma de Madrid (mención europea). Director: José Berenguer.

Zahra Chahlaflí (2012) Caracterización de la regulación por nitrato en la respiración anaeróbica de *Thermus thermophilus*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José Berenguer.

Marcos Almendros Giménez (2011) Nuevas enzimas termoestables aplicadas a la síntesis de nucleósidos farmacológicamente activos. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: José Berenguer y Josep Vicent Sinisterra.

Federico Acosta Castro (2011) Incorporación de subunidades y crecimiento de la capa S de *Thermus thermophilus*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José Berenguer.

Eloy Roberto Ferreras Puente (2011) Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José Berenguer.

Patentes / Patents

Torres, L. L., Hidalgo, A., Ferreras, E. R., Berenguer, J. "Polipéptido termoestable con actividad penicilina acilasa, variantes del mismo y sus aplicaciones". Número de prioridad: P201230729. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 14-05-2012.

Hidalgo, A., Rivera, N., Sánchez, E., Berenguer J. "Polipéptido termoestable con actividad esterasa, variantes del mismo y sus aplicaciones" Número de solicitud: P201231439. país de prioridad: España. Fecha de prioridad: 17-09-2012.

Virus de la peste porcina africana: modelos virales de evasión y protección

African swine fever virus: models of evasion and protection



Jefe de Línea / Group Leader:
Ángel L. López Carrascosa

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Patricia de León Valdés

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
María José Bustos Sánchez

Estudiantes / Undergraduate
Students:
Alba Martínez Flórez

Resumen de investigación

Durante el periodo considerado en esta Memoria, nuestro Grupo ha continuado investigando sobre el virus de la peste porcina africana (VPPA) como modelo en la evasión de la respuesta antiviral celular y para la generación de estirpes vacunales que puedan inducir inmunidad protectora en cerdos contra la PPA. Mediante el uso de diversas líneas celulares establecidas susceptibles a muchos aislados virales de campo y de laboratorio, hemos podido abordar:

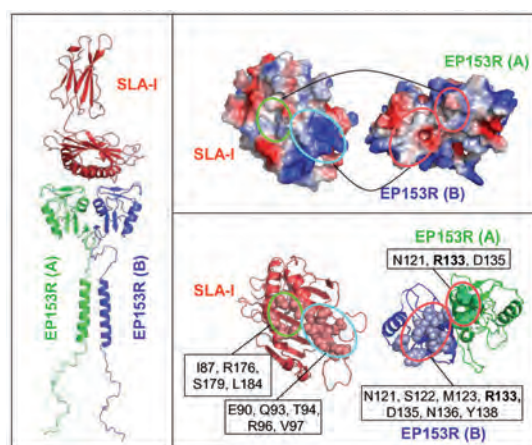
- La construcción de virus recombinantes con genes específicos delecionados a partir del aislado NHV (capaz de generar inmunidad cruzada contra aislados virulentos de distinto genotipo), que presenta una virulencia residual demasiado elevada para ser vacunal, al que pretendemos atenuar mediante la inactivación de genes relacionados con la evasión de la respuesta inmune
- El estudio de la modulación por el gen viral EP153R de la expresión de antígenos MHC-I en la membrana de la célula infectada
- El análisis de los niveles de síntesis de una serie de citoquinas en células porcinas (WSL, IPAM y macrófagos alveolares) infectadas por aislados virales con distinto grado de virulencia

Asimismo, y en colaboraciones con otros Grupos de investigación hemos contribuido en el estudio de nuevas técnicas de detección del virus, de los mecanismos de entrada viral y la optimización del uso de antivirales no convencionales como el Lauril Galato para la prevención de la PPA en infecciones *in vivo* y determinado su toxicidad en los modelos murino y porcino.

La relevancia científica de la investigación realizada se podría resumir en la posible generación de una vacuna eficaz y segura contra la PPA, la posible obtención de un "perfil de virulencia" por ensayos *in vitro* para cualquier aislado de VPPA y en la optimización de tratamientos preventivos contra la PPA, de posible aplicación práctica en países donde la enfermedad es enzoótica y escasamente controlada.

Figura 1. Interacción entre EP153R y SLA-I. Residuos implicados.

Figure 1. Interaction EP153R - SLA-I. Residues involved.



Research summary

During this period our group has continued the study of the African swine fever virus (ASFV) as a model in the evasion of cellular antiviral response and for the generation of vaccine strains able to induce protective immunity in pigs against ASF. Through the use of various established cell lines susceptible to many virus isolates (either from the field or laboratory), we have been able to address:

- The construction of recombinant viruses with specific genes deleted from the NHV isolate (able to generate protective immunity against virulent ASFV strains with different genotype), which presents a residual virulence unacceptably high for a vaccine, that we pretend to attenuate through the inactivation of virus genes involved in immune evasion
- The study of the modulation of the expression of MHC-I antigens in the infected cell membrane by the viral gene EP153R
- The analysis of the synthesis of a number of cytokines in porcine cells (WSL, IPAM and alveolar macrophages) infected by ASFV isolates with different degree of virulence

Likewise, and in collaborations with other research groups we have contributed in the study of new techniques for virus detection, in viral entry mechanisms and optimizing the use of non-conventional antivirals like the lauryl gallate for ASFV prevention in in vivo infections and the evaluation of its toxicity in murine and porcine animal models.

The scientific relevance of the research can be summarized in the possible generation of a safe and effective vaccine against the ASF, a possible "virulence profile" obtained by in vitro assays for any ASFV isolate, and the optimization of preventive treatments against ASFV with a possible practical application in poorly-developed countries where the disease was enzootic and out of control.

Publicaciones / Publications

Hurtado, C., Bustos, M.J., Granja, A.G., de León, P., Sabina, P., Lopez-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Revilla, Y., and Carrascosa, A.L. (2011) The African swine fever virus lectin EP153R modulates the surface membrane expression of MHC class I antigens. *Arch. Virol.* **156**, 219-234.

Carrascosa, A.L., Bustos, M.J., and de León, P. (2011) Methods for growing and titrating African Swine Fever Virus field and laboratory virus samples. *Current Protocols in Cell Biology* **53**, 26.14.1-26.14.25.

Sánchez, E.G., Quintas, A., Núñez, D.P., Nogal, M., Barroso, S., Carrascosa, A.L. and Revilla, Y. (2012) African Swine Fever Virus Uses Macropinocytosis to Enter Host Cells. *PLoS Pathog* **8**(6): e1002754. doi:10.1371/journal.ppat.1002754

Gallardo, C., Soler, A., Nieto, R., Carrascosa, A.L., De Mia, G.M., Bishop, R.P., Martins, C., Folorunso, O.F., Couacy-Hymman, E., Heath, L., Martín, E., Simón, A., Martín, R., and Arias, M. (2012) Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests. *Vet. Microbiol.*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.011>

De León, P., Bustos, M.J., and Carrascosa, A.L. (2012) Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus Res*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.013>

Patentes / Patents

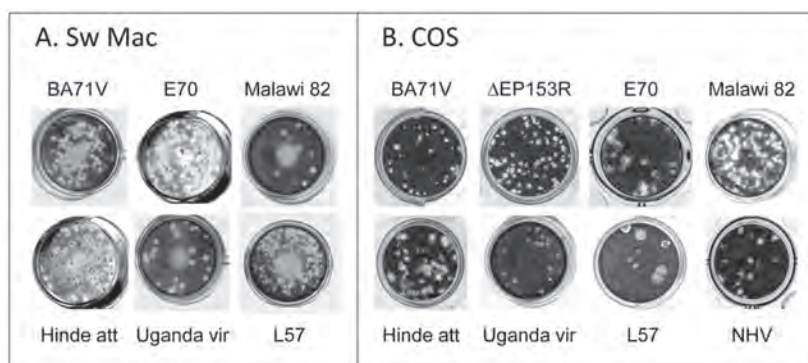
Material Transfer Agreement with Augmenta Biologicals, LLC, for the evaluation and use of Hybridoma 1AC11, producing antibody against porcine glycoprotein A, for development and commercialization under a commercial license agreement". Inventores: Diego Llanes, Marisa Nogal, Angel L. Carrascosa & Eladio Viñuela Entidad titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and The University of Cordoba (UCO). License pending.

Otras actividades / Other activities

Coordinador de la Asignatura "La biología de los virus" en el Máster de Virología organizado en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid por la Sociedad Española de Virología (SEV-UCM), durante los Cursos 2010-11 y 2011-12.

Figura 2. Placas de lisis de aislados del VPPA en macrófagos porcinos (A) y células COS (B).

Figure 2. Plaques developed by ASFV isolates in monolayers of swine macrophages (A) or COS cells (B).



Morfogénesis bacteriana

Bacterial morphogenesis



Jefe de Línea / *Group Leader*:
Miguel Ángel de Pedro Montalbán

Personal Científico / *Graduate Students*:
Felipe Cava Valenciano

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Akbar Espaillat
Olga Sambricio
Irene Cartas

Resumen de investigación

Nuestra investigación se centra en el estudio a nivel molecular y fisiológico de la pared celular (sáculo) como elemento morfogénico primario de la célula bacteriana. Además de continuar nuestro trabajo sobre los mecanismos de síntesis y crecimiento de la pared celular en bacterias de ciclo polimórfico, durante los últimos dos años hemos dedicado un importante esfuerzo en dos nuevas direcciones: la caracterización del proceso de producción y liberación de D-amino ácidos por algunas especies bacterianas y el estudio de la diversidad y plasticidad de la pared bacteriana. En el primer caso estamos estudiando la bioquímica y fisiología del proceso, así como su significado en ambientes naturales y comunidades poli-microbianas donde este tipo de mecanismo parece jugar un papel importante de señalización y sincronización de respuestas.

Queremos determinar el grado de dispersión del mecanismo ya establecido (liberación de D-amino ácidos) y la posible existencia de mecanismos similares mediados por otros tipos de moléculas efectoras. En el segundo caso, estamos centrando nuestros esfuerzos en una mejor evaluación del grado de diversidad estructural y composicional de las paredes celulares bacterianas, así como de las variaciones de tipo adaptativo que sufren las paredes bacterianas en respuesta a cambios en las condiciones medio ambientales de la bacteria, incluyendo procesos patológicos. Ambos aspectos parecen mucho más diversos de lo generalmente supuesto y su conocimiento preciso permitirá una mejor comprensión de la evolución bacteriana ofreciendo, además, múltiples oportunidades para el control específico de poblaciones poli-microbianas naturales. En el futuro inmediato seguiremos trabajando en la misma dirección y haremos un esfuerzo especial en el desarrollo de protocolos apropiados para un estudio sistemático y masivo de la variabilidad y modo de crecimiento de las paredes celulares.

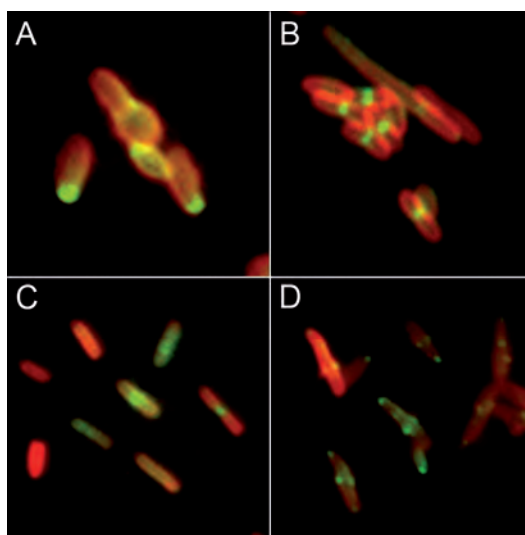


Figura 1. Visualización "in vivo" de los sitios de síntesis de la pared celular en: A) *Rhizobium meliloti*, B) *Roseobacter litoralis*, C) *Erythrobacter aquimaris* and D) *Asticcacaulis biprosthecium*, con un D-amino ácido fluorescente.

Figure 1. "In vivo" visualization of cell wall biosynthetic sites in: A) *Rhizobium meliloti*, B) *Roseobacter litoralis*, C) *Erythrobacter aquimaris* and D) *Asticcacaulis biprosthecium*, with a fluorescent D-amino acid.

Research summary

Our research is focused on the study at the molecular and physiological levels of the cell wall (sacculus) as the primary morphogenetic element of the bacterial cell. We continued working out the mechanisms of synthesis and growth of the cell wall in polymorphic bacteria. In addition, in the last two years we made important efforts in two new directions: the characterization of the process of D-amino acid production and release by some bacterial species, and the study of the diversity and plasticity of the bacterial wall. In the first case, we are studying the biochemistry and physiology of the process, as well as its biological meaning in natural environments and poly-microbial communities. This type of mechanism may play an important role in signaling and timing responses in communities where different bacterial species compete.

We want to establish the dispersion of the established mechanism (release of D-amino acids) and look for similar mechanisms mediated by other types of effector molecules. In the second case, we are focusing our efforts on a better assessment of the structural and compositional diversity of bacterial cell walls (variability), and the adaptive responses of the cell wall to changing environmental conditions (plasticity), including pathological processes. Both aspects seem to be far more variable than previously suspected. An accurate knowledge of both would lead to a better understanding of bacterial evolution and adaptation, and could open new ways to control natural populations. For the immediate future we will continue our current research, and start development of new methods for a systematic and massive analysis of cell wall diversity and growth pattern

Publicaciones / Publications

Cava, F., de Pedro, M.A., Lam, H., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2011) Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *EMBO J.* **30**, 3442-3453.

Cava, F., Lam, H., de Pedro, M.A., and Waldor, M.K. (2011) Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**:817-831.

Slamti, L., de Pedro, M.A., Guichet, M., and Picardeau, M. (2011) Deciphering morphological determinants of the helix shaped *Leptospira*. *J. Bacteriol.* **193**, 6266-6275.

González-Leiza, S.M., de Pedro, M.A., and Ayala, J.A. (2011) AmpH, a bifunctional DD-endopeptidase and DD-carboxypeptidase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **193**, 6887-6894.

Acosta, F., Alvarez, L., de Pedro, M.A., and Berenguer, J. (2012) Localized synthesis of the outer envelope from *Thermus thermophilus*. *Extremophiles* **16**, 267-275.

Brown, P.J.B., de Pedro, M.A., Kysela, D.T., Van der Henst, C., Kim, J., De Bolle, X., Fuqua, C., and Brun, Y.V. (2012). Polar growth in the Alphaproteobacterial order Rhizobiales. *PNAS* **109**, 1697-1701.

Horcajo, P., de Pedro, M.A., and Cava, F. (2012) Peptidoglycan plasticity in bacteria: Stress-induced peptidoglycan editing by noncanonical D-amino acids. *Microb. Drug Resist.* **18**, 306-313.

Potluri, L.P., de Pedro, M.A., and Young, K.D. (2012) *Escherichia coli* low-molecular-weight penicillin-binding proteins help orient septal FtsZ and their absence leads to asymmetric cell division and branching. *Mol. Microbiol.* **85**, 203-224.

Ayala, J.A., Cava, F., and de Pedro, M.A. (2012) CWSR systems in Gram negative bacteria. In: Requena, J.M. (Ed) Stress response in microbiology. Caister Academic Press, Norfolk, UK. pp 1-18.

Acosta, F., de Pedro, M.A., and Berenguer, J. (2012) Homogeneous incorporation of secondary cell wall polysaccharides to the cell wall of *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* **16**, 485-495.

Kuru, E., Velocity Hughers, H., Brown, P.J., Hall, E., Tekkam, S., Cava, F., de Pedro, M.A., Brun, Y.V., and VanNieuwenhze, M.S. (2012) In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 12519-12523.

Variabilidad genética de virus RNA

Genetic variability of RNA viruses

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Esteban Domingo Solans

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Celia Perales Viejo
Julie Sheldon
Nathan M. Beach
Verónica Martín García

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Héctor Moreno Borrego
Ignacio de la Higuera Hernández

Ana M^a Ortega Prieto
Elena Moreno del Olmo

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Ana Isabel de Ávila Lucas
Isabel Gallego Jiménez
M^a Eugenia Soria Benito
(hasta Septiembre 2012)

Científico visitante /
Visiting Scientist:
Héctor Tejero Franco

Resumen de investigación

El interés principal de nuestro laboratorio es entender como la dinámica de cuasiespecies permite la adaptación de virus ARN a ambientes cambiantes, así como explorar tratamientos antiviricos que contrarresten la capacidad adaptativa de los virus. Durante los últimos años hemos estudiado experimentalmente y con modelos teóricos elaborados en colaboración con la Dra. Susanna Manrubia (Centro de Astrobiología, CSIC-INTA) la interacción entre agentes mutagénicos e inhibidores como factor de eficacia de tratamientos basados en mutagénesis letal (extinción de virus por exceso de mutaciones). Hemos empleado como virus modelo el virus de la fiebre aftosa y el virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (LCMV). Recientemente hemos iniciado investigaciones con el virus de la hepatitis C (HCV) en cultivos celulares, con los mismos objetivos.

Como resultados concretos obtenidos estos dos últimos años cabe mencionar la confirmación de que un tratamiento secuencial inhibidor-mutágeno puede tener una ventaja sobre el correspondiente tratamiento de combinación. Se han definido los rangos de parámetros replicativos y mutacionales en los cuales se observa la ventaja de la terapia secuencial. En una línea complementaria de investigación hemos demostrado que el análogo de nucleósido ribavirina puede ser mutagénico para LCMV. Este resultado puede tener consecuencias prácticas ya que la ribavirina ofrece en estos momentos una de las pocas opciones terapéuticas para el tratamiento de las fiebres hemorrágicas asociadas a infección por arenavirus y hasta ahora se consideraba un inhibidor no mutagénico de la replicación viral.

Estamos participando activamente en colaboraciones con otros grupos, como queda reflejado en la lista de publicaciones. Seguimos los desarrollos en clínica para tratamientos contra las infecciones por HCV como parte del CIBERehd (Centro de Investigación en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas) con el objetivo de aplicar nuestras conclusiones con sistemas modelo en cultivos celulares a la mejora de los tratamientos antivirales.

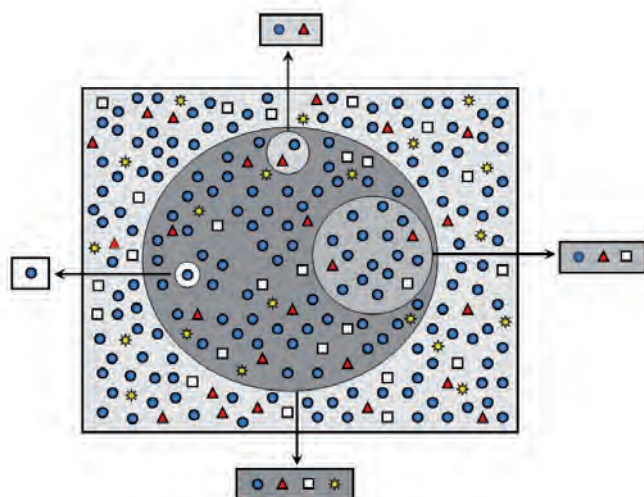


Figura 1. El tamaño poblacional de un virus determina el repertorio de variantes.

Figure 1. The viral population size determines the variant repertoire.

Research summary

The main interest of our laboratory is to understand how quasispecies dynamics allows adaptation of RNA viruses to changing environments, and to explore antiviral treatments that counteract the adaptive capacity of viruses. In the last years we have studied experimentally and with theoretical models developed in collaboration with Dr. Susanna Manrubia (Centro de Astrobiología, CSIC-INTA) the interaction between mutagenic agents and inhibitors as an efficacy determinant of treatments based on lethal mutagenesis (virus extinction through excess of mutations). We have used as model viruses foot-and-mouth disease virus and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). Recently we have started work with hepatitis C virus (HCV), with the same objectives.

As specific results obtained over the last years, we may mention the confirmation that a sequential inhibitor-mutagen treatment may have an advantage over the corresponding combination treatment. We have defined the range of replicative and mutational parameters in which the advantage of sequential therapy is observed. In a complementary line of research we have demonstrated that the nucleoside analogue ribavirin can be mutagenic for LCMV. This result can have practical consequences because ribavirin offers at present one of few therapeutic options for treatment of hemorrhagic fevers associated with arenavirus infection, and until now it was considered a non-mutagenic inhibitor of viral replication.

We participate actively in collaborations with other groups, as reflected in the publication list. We follow clinical developments concerning anti-HCV treatments, as part of CIBERehd (a Spanish network on hepatic diseases), with the objective of applying our conclusions with model systems in cell culture to the improvement of antiviral treatments.

Publicaciones / Publications

Domingo, E. (2011). Variabilidad genética de los virus de la hepatitis B y C. *Gastroenterol. Hepatol.* **34** (Espec Congr 1): 51-57.

Perales, C., Agudo, R., Manrubia, S.C., and Domingo, E. (2011). Influence of mutagenesis and viral load on the sustained, low-level replication of an RNA virus. *J. Mol. Biol.* **407**: 60-78.

Ojosnegros, S., García-Arriaza, J., Escarmís, C., Manrubia, S.C., Perales, C., Arias, A., García-Mateu, M., and Domingo, E. (2011). Viral genome segmentation can result from a trade-off between genetic content and particle stability. *PLoS Genetics*, **7**(3): e1001344.

Domingo, E. (2011). Paradoxical interplay of viral and cellular functions. *Viruses* **3**(3), 272-277.

Moreno, H., Gallego, I., Sevilla, N., de la Torre, J.C., Domingo, E., and Martín, V. (2011). Ribavirin can be mutagenic for arenaviruses. *J. Virol.* **85**(14):7246-55.

Iranzo, J., Perales, C., Domingo, E., and Manrubia, S.C. (2011). Tempo and mode of inhibitor-mutagen antiviral therapies: A multidisciplinary approach. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108** (38):16008-13.

Perales, C., Henry, M., Domingo, E., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J.P. (2011). Lethal mutagenesis of foot-and-mouth disease virus involves shifts in sequence space. *J. Virol.*, **85**(23): 12227-12240.

Ojosnegros, S., Perales, C., Mas, A., and Domingo, E. (2011). Quasispecies as a matter of fact: viruses and beyond. *Virus Res.*, **162**(1-2): 203-215.

Perales, C., Martín, V., and Domingo, E. (2011). Lethal mutagenesis of viruses. *Current Opinion in Virology*, **1**(5): 419-422.

Domingo, E. (2011). Virus como modelo en Biología. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia* 62: 9-18.

Simmonds, P., and Domingo, E. (2011). Virus evolution. *Curr. Opin. Virol.*, **1**(5):410-412.

Sánchez-Jiménez, C., Olivares, I., de Ávila Lucas, A.I., Toledano, V., Gutiérrez-Rivas, M., Lorenzo-Redondo, R., Grande-Pérez, A., Domingo, E., and López-Galíndez, C. (2012). Mutagen-mediated enhancement of HIV-1 replication in persistently infected cells. *Virology*, **424**(2):147-53.

Moreno, H., Tejero, H., de la Torre, J.C., Domingo, E., and Martín, V. (2012). Mutagenesis-mediated virus extinction: virus-dependent effect of viral load on sensitivity to lethal defection. *PLoS One*, **7**(3):e32550.

Domingo, E., Sheldon, J., and Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **76**(2): 159-216.

Rodríguez-Frías, F., Tabernero, D., Quer, J., Esteban, J.I., Ortega, I., Domingo, E., Cubero, M., Camós, S., Ferrer-Costa, C., Sánchez, A., Jardí, R., Schaper, M., Homs, M., García-Cehic, D., Guardia, J., Esteban, R., and Buti, M. (2012) Ultra-Deep Pyrosequencing Detects Conserved Genomic Sites and Quantifies Linkage of Drug-Resistant Amino Acid Changes in the Hepatitis B Virus Genome. *PLoS ONE* **7**(5): e37874.

Perales, C., Iranzo, J., Manrubia, S.C., and Domingo, E. (2012). The impact of quasispecies dynamics on the use of therapeutics. *Trends Microbiol.*, **20** (12): 595-603.

Domingo, E. and Perales, C. (2012). From quasispecies theory to viral quasispecies: how complexity has permeated virology. *Math. Model. Nat. Phenom.* **7**(2): 32-49.

Moreno, H., Grande-Pérez, A., Domingo, E., and Martín, V. (2012). Arenaviruses and lethal mutagenesis. Prospects for new ribavirin-based interventions. *Viruses*, **4**, 2786-2805;doi:10.3390/v4112786.

Otras actividades / Other activities

Académico Numerario de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, adscrito a la Sección de Ciencias Naturales, (2011).

Miembro de la Red Española de Biofísica, coordinada por el Dr. David Reguera, desde 2011.

Miembro del Global Virology Network, coordinado por el Dr. Robert Gallo, desde 2011.

Miembro del Comité Organizador del Congreso FEMS 2011 (Ginebra, Suiza, 2011).

Editor asociado de la revista *Virus Research* desde 2012 / Associated editor *Virus Research*, since 2012.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Héctor Moreno Borrero (2012). Dinámica poblacional del virus de la coriomeningitis linfocitaria ratón en su interacción con agentes mutagénicos. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Esteban Domingo y Verónica Martín.

Patentes / Patents

N. Sevilla, E. Domingo, C. Escarmís, S. Ojosnegros, J. García-Arriaza, M. Sanz-Rojo, T. Rodríguez. "Vacuna atenuada para la fiebre aftosa". N° DE SOLICITUD: P200801583. Patente concedida en España el 16/06/2011. N° PUB: ES2344875.

Bioingeniería de enzimas de levaduras para generar compuestos bioactivos

Yeast enzymes bioengineering to generate bioactive compounds



Jefe de Línea / *Group Leader:*
María Fernández Lobato

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Miguel de Abreu Felipe
Miguel Álvaro Benito
Patricia Gutiérrez Alonso
María Gimeno Pérez

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
M^a Asunción Martín Redondo

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
Hugo Muñoz Hernández
María Gimeno Pérez

Laura Perezabad García
José Antonio Cañas Mañas
Estefanía Alcaide Hernández
Cristina Sancho Postigo
Sofía Relaño Pérez
Santiago Caño Muñiz
Sabrina Galiñanes Reyes

Científicos Visitantes
/Visiting Scientists:
Antonio Jiménez Martínez
Oriana Flores Díaz
(Universidad de Chile)
Víctor Cifuentes
(Universidad de Chile)

Resumen de investigación

Trabajamos con microorganismos de interés biotecnológico, básicamente *Streptomyces* y levaduras, productores de compuestos bioactivos (entre ellos antibióticos y moléculas con actividad prebióticas). Tratamos de conectar la generación de conocimiento con el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, y básicamente nos centramos en la caracterización de nuevas enzimas productoras de compuestos bioactivos, el análisis de sus determinantes estructurales-funcionales, su mejora funcional utilizando herramientas de biología molecular y en la obtención y caracterización de nuevas moléculas con actividad biológica de posible utilidad industrial. Hemos patentado ya en distintos países la aplicabilidad industrial de la mayoría de las proteínas caracterizadas y diseñado un método eficaz para su fijación a soportes sólidos.

Durante los últimos dos años hemos estado caracterizando y estudiando distintas proteínas de levaduras no convencionales (géneros *Xanthophyllomyces*, *Schwanniomyces*, *Rhodotorula*, etc.) con actividad glicosiltransferasa, aplicables en la producción de azúcares con propiedades prebióticas. Todas ellas son glicosilhidrolasas (GH) estructuralmente incluidas en las familias GH32, 31, 1 y 2. Hemos resuelto la estructura 3D de la primera proteína de levadura incluida en la familia GH32, asignado una función al dominio beta-sandwich que está presente en todos los miembros de la familia y probado que la oligomerización está implicada directamente en el reconocimiento del sustrato y especificidad. Hemos obtenido numerosas variantes de estas enzimas que aumentan o alteran el patrón de productos obtenidos en reacción biosintética. Aislado y caracterizado los productos sintetizados y optimizado las condiciones para las reacciones biosintéticas.

Pretendemos extender nuestro estudio a hidrolasas incluidas en otras familias estructurales, y aumentar/modificar la actividad transferasa de las enzimas ya estudiadas para favorecer su utilización biotecnológica y escalar hasta un nivel industrial tanto su producción como la de los productos generados.

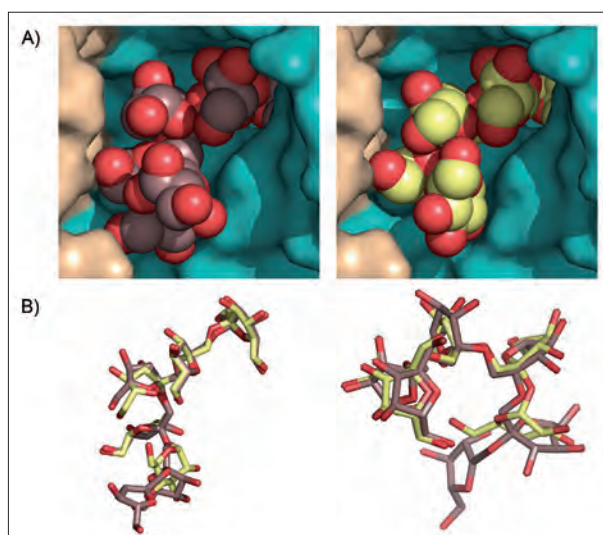


Figura 1. Substratos en el sitio activo de la Ffase. A. Vista del centro activo. Las seis unidades de la molécula de inulina (izquierda) y fructosilnístosa (derecha) detectadas en el centro activo de los mutantes inactivados se representan con esferas. B. Moéculas de inulina (marrón) y fructosilnístosa (verde lima) representadas en stick superimpuestas.

Figure 1. The conformation of the substrates at the Ffase active site. A. Close-up view of the active site. The six units of inulin (left) and fructosylinystose (right) molecules found in the inactivated mutants are represented as spheres. B. Inulin (brown) and fructosylinystose (lime green) moieties in stick representation are superimposed.

Research summary

We work with microorganisms of biotechnological interest, mainly *Streptomyces* and yeasts, producers of bioactive compounds (including antibiotics and molecules with prebiotic activity). We try to connect the generation of knowledge to the development of biotechnological applications. Basically we focus on the characterization of new bioactive compounds producing enzymes, the analysis of structural-functional determinants, functional improvement using molecular biology tools and obtaining and characterization of new molecules with potential biological activity of industrial utility. We have patented in different countries the industrial applicability of most proteins characterized and designed an effective method for their attachment to solid supports.

During the last two years we have been characterizing and studying various non conventional yeast proteins (from genera *Xanthophyllomyces*, *Schwanniomyces*, *Rhodotorula*, etc.) showing glycosyltransferase activity, and applicable in the production of sugars with prebiotic properties. All are glycosylhydrolases (GH) structurally included in family GH32, 31, 1 or 2. Indeed, we have resolved the 3-D structure of the first yeast protein including in family GH32, assigned a function to the beta-sandwich domain that is present in all members of this family and proved that the oligomerization is directly involved in the substrate recognition and specificity. We have obtained numerous variants of these enzymes that increase or alter the pattern of biosynthetic products. Isolated and characterized the formed products and optimized the biosynthetic reactions. We intend to extend our study to hydrolases including in other structural families, to increase / modify transferase activity of the enzymes studied, and to scale up to industrial level the enzyme production and the products generated.

Publicaciones / Publications

de Abreu, M. A., Álvaro-Benito, M., Plou, F. J., Fernández-Lobato, M., and Alcalde, M. (2011) Screening β -Fructofuranosidases Mutant Libraries to Enhance the Transglycosylation Yield of β -(2 $\rightarrow$ 6) Fructooligosaccharides. *Com. Chem. High Throughput Screen.* **14** (8), 730-738.

Rodríguez-Colinas, B., de Abreu, M.A., Fernández-Arrojo, L., de Beer, R., Poveda, A., Jiménez-Barbero, J., Ballesteros, A., Fernández-Lobato, M., and Plou, F. J. (2011) Production of galactooligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 10477-10484.

Linde, D., Estévez, M., Plou, F. J., and Fernández Lobato, M. (2012) Analysis of the neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular β -fructofuranosidase Xd-INV from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresour. Technol.* **109**, 123-130.

Alvaro-Benito, M., Sainz-Polo, M.A., González, B., Plou, F.J., Fernández-Lobato*, M., and Sanz-Aparicio*, J. (2012) Structural and kinetic insight reveal that the amino acid pair Gln-228/Asn-254 modulates the transfructosylating specificity of *Schwanniomyces occidentalis* β -fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics. *J. Biol. Chem.* **287**, 19674-19686. *co-corresponding authors.

Alvaro-Benito, M., Fernández Lobato, M., Baronian, K., and Kunze, G. (2012) Assessment of *Schwanniomyces occidentalis* as a host for protein production using the wide-range Xplor®2 expression platform. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Nov. 2012. pp. 1-14. (on line: DOI 10.1007/s00253-012-4527-9).

Baeza, M., Fernández-Lobato, M., and Cifuentes, V. (2012) Extrachromosomal double-stranded RNA elements in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. In: Barredo, JL (ed) *Microbial Carotenoids from Fungi. Methods in Molecular Biology*. Springer Protocols. Humana Press-Springer Science-Business Media NY, pp.195-2005.

Niklitschek, M., Baeza, M., Fernández-Lobato, M., and Cifuentes, V. (2012) Generation of Astaxanthin mutants in *Xanthophyllomyces dendrorhous* using a Double Recombination Method based on Hygromycin Resistance. In: Barredo, JL (ed) *Microbial Carotenoids from Fungi. Methods in Molecular Biology*. Springer Protocols. Humana Press-Springer Science-Business Media NY, pp. 219-234.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Miguel Antonio de Abreu Felipe (2011). Studies aimed at improving the functionality of non-conventional yeast enzymes able to synthesize prebiotic oligosaccharides. Universidad Autónoma de Madrid. Doctorado Europeo 31-3-2011. Director: María Fernández Lobato.

Miguel Álvaro Benito (2011). The study of β -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* reveals new functional elements in the family GH32 of glycosyltransferases and an unconventional genetic code use in this yeast. Universidad Autónoma de Madrid. Doctorado Europeo 21-7-2011. Director: María Fernández Lobato.

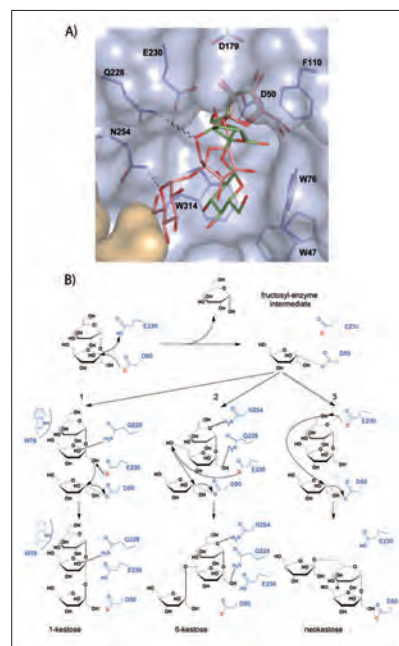
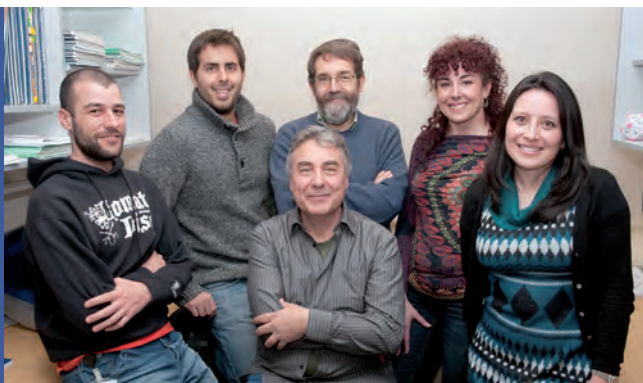


Figura 2. Mecanismo propuesto para la actividad transfructosilante de la Flase. A. Posición inferida de 1-kestosa (verde) y 6-kestosa (rosa). B. Ilustración esquemática del mecanismo propuesto.

Figure 2. Proposed mechanism of Flase transfructosylating activity. The inferred position of 1-kestose (green) 6-kestose (pink). B. Schematic illustration of the proposed mechanism.

Ingeniería de Virus y Nanobiotecnología

Virus Engineering and Nanobiotechnology



Jefe de Línea / Group Leader:
Mauricio García Mateu

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Milagros Castellanos Molina
Verónica Rincón Forero

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Rebeca Bocanegra Rojo
Pablo José Pérez Carrillo

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Miguel Ángel Fuertes Villadangos
Alicia Rodríguez Huete

Resumen de investigación

Objetivos científicos principales: Utilizamos técnicas de ingeniería de proteínas y análisis bioquímicos, biofísicos y biológicos para el estudio del ensamblaje, estabilidad y dinámica conformacional de virus (revisado en Mateu (2013) *Arch. Biochem. Biophys.*, 531, 65-79); Además nos basamos en los resultados de estos estudios para el diseño y análisis de partículas víricas genética y estructuralmente modificadas con vistas a aplicaciones en biomedicina y bionanotecnología (revisado en Mateu (2011). *Prot. Eng. Des. Sel.* 24, 53-63).

Relevancia científica e implicaciones tecnológicas: Conocimiento en profundidad de ciertas etapas clave del ciclo vírico, incluyendo ensamblaje, reordenamientos estructurales y desensamblaje de virus; aplicación de este conocimiento al diseño de vacunas, fármacos antivirales y nanopartículas para la liberación dirigida de fármacos.

Algunos resultados recientes: i) Mediante ingeniería de proteínas hemos aumentado la estabilidad térmica del virus de la fiebre aftosa frente a su disociación en subunidades. Estamos investigando las bases moleculares de esta termoesabilización y las posibilidades vacunales de estos virus modificados. ii) En colaboración con otros grupos, estamos investigando las bases moleculares del ensamblaje de la cápsida del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y modos de inhibir este proceso, con vistas al diseño de nuevos fármacos anti-HIV. iii) En colaboración con un grupo de físicos, estamos investigado mediante microscopía de fuerzas atómicas (técnica que utilizamos en nuestro laboratorio) la relación entre propiedades mecánicas (elasticidad) de partículas víricas y la estabilidad y dinámica conformacionales de estas. Para estos estudios utilizamos el virus diminuto del ratón (MVM) como modelo. Los objetivos básicos de este estudio son determinar si las propiedades mecánicas de los virus tienen un papel en la biología del virus y, de tenerlo, cuál es ese papel. Además, estos estudios se orientan al diseño de nanopartículas víricas con propiedades mejoradas para usos biomédicos (liberación dirigida de fármacos) y nanotecnológicos (nuevos nanodispositivos).

Figura 1. Desensamblaje gradual de una partícula individual del virus MVM mediante aplicación de fuerza mecánica, usando un microscopio de fuerzas atómicas. (A), imagen (positiva y negativa) de la partícula vírica intacta. (B), la aplicación de fuerza sobre esa misma partícula ha provocado la separación de una subunidad, abriendo un hueco en la cápsida. (C), una nueva aplicación de fuerza sobre la misma partícula ha provocado la separación de una segunda subunidad. Los huecos dejados por las subunidades perdidas se pueden observar en las imágenes (en las posiciones que indican los triángulos negros en los esquemas de la derecha).

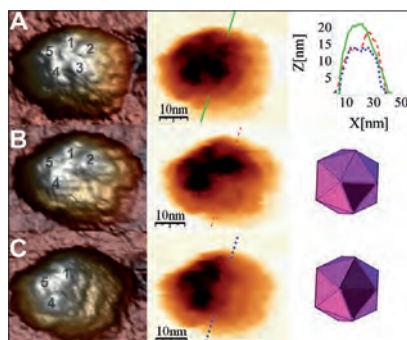


Figure 1. Gradual disassembly of a single particle of MVM virus through application of mechanical force, using an atomic force microscope. (A) image (positive and negative) of the intact MVM particle. (B), application of force on that same particle has released a subunit, leaving a hole in the capsid. (C), further application of force on the same particle has released a second subunit. Holes left by the removed subunits can be observed in the images (at the positions indicated by black triangles in the schemes at right).

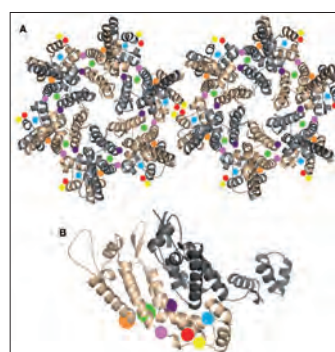


Figure 2. Targets for antiviral therapy identified in the mature HIV capsid. The capsid is made of hexamers of the capsid protein CA. (A), two bound hexamers are shown. (B), two neighboring CA monomers in a same hexamer are represented. Colored circles indicate the binding sites of different capsid assembly-inhibiting anti-HIV compounds identified or designed by us or other research groups.

Research summary

We use protein engineering techniques and biochemical, biophysical and biological analyses to study assembly, conformational stability and dynamics of viruses (reviewed in Mateu (2013) *Arch.Biochem.Biophys.*, 531, 65-79); based on these studies we aim also at the design and analysis of genetically and structurally modified viral particles for the development of applications in medicine and bionanotechnology (reviewed in Mateu (2011). *Prot.Eng.Des.Sel.* 24, 53-63).

Scientific relevance and technological implications: In-depth knowledge of certain key stages of the viral life cycle, including virus assembly, structural rearrangements and disassembly; application of this knowledge for the design of vaccines, antiviral drugs and nanoparticles for targeted drug delivery.

Some recent results: i) We have used protein engineering to increase the thermal stability of foot-and-mouth disease virus against dissociation into subunits. We are investigating the molecular determinants of virus thermostabilization and the potentiality of these modified viruses as improved vaccines. ii) In collaboration with other groups we are studying human immunodeficiency virus (HIV) assembly as well as approaches to inhibit this process, aimed at the development of novel anti-HIV drugs. iii) In collaboration with a group of physicists, we are using atomic force microscopy (a technique in current use in our own laboratory) and other techniques to study the relationship between mechanical properties (elasticity) of viral particles, and virus conformational stability and dynamics. For these studies we use the minute virus of mice (MVM) as a model, with the basic aim of determining whether the mechanical properties of viruses have any role in their biology, and what this role could be. In addition, these studies are oriented towards the design of viral nanoparticles with improved properties for biomedical uses (targeted drug delivery) and nanotechnological uses (novel nanodevices).

Publicaciones / Publications

Mateu, M.G. (2011). Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Eng. Des. Sel.* 24, 53-63.

Ojosnegros, S., García-Arriaza, J., Escarmís, C., Manrubia, S.C., Perales, C., Arias, A., Mateu, M.G., and Domingo, E. (2011). Increase in the stability of infectious viral particles can drive evolution towards viral genome segmentation. *PLoS Genetics* 7(3):e1001344.

Martín-Acebes, M.A., Vázquez-Calvo, A., Rincón, V., Mateu, M.G., and Sobrino, F. (2011). J.Virol. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid resistance. *J. Virol.* 85, 2733-2740.

Rincón, V., Bocanegra, R., Rodríguez-Huete, A., Rivas, G., and Mateu, M.G. (2011). Effects of macromolecular crowding on the inhibition by small peptides of virus assembly and attachment to host cells. *Biophys. J.* 100, 738-746.

Bocanegra, R., Domenech, R., Nevot, M., Rodríguez-Huete, A., López, I., Fuertes, M.A., Cavaotto, C., Martínez, M.A., Neira, J.L., and Mateu, M.G. (2011). Rationally designed interfacial peptides are efficient in vitro inhibitors of HIV-1 capsid assembly with antiviral activity. *PLoS ONE* 6, e23877.

Domenech, R., Bocanegra, R., González, R., Gómez, J., Mateu, M.G., and Neira, J.L. (2011). Larger helical populations in peptides derived from the dimerization helix of the capsid protein of HIV-1 results in peptide binding towards regions other than the hotspot interface. *Biomacromolecules* 12, 3252-3264.

Pérez, R., Castellanos, M., Rodríguez-Huete, A., and Mateu, M.G. (2011). Molecular determinants of self-association and rearrangement of a trimeric intermediate during the assembly of a parvovirus capsid. *J. Mol. Biol.* 413, 32-40.

Martínez-Martín, D., Carrasco, C., Pérez, R., Mateu, M.G., Carrasco, J.L., Kiracofe, D., Raman, A., de Pablo, P.J., and Gómez-Herrero, J. (2012). Resolving structure and mechanical properties at the nanoscale of viruses with frequency modulation atomic force microscopy. *PLoS ONE* 7, e30204.

Castellanos, M., Pérez, R., Carrillo, P.J.P., de Pablo, P.J., and Mateu, M.G. (2012). Mechanical disassembly of single virus particles reveals kinetic intermediates predicted by theory. *Biophys. J.* 102, 2615-2624.

Mateu, M.G. (2012). Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: a virological perspective. *Virus Res.* 168, 1-22.

Castellanos, M., Pérez, R., Carrasco, C., Hernando-Pérez, M., Gómez-Herrero, J., de Pablo, P.J., and Mateu, M.G. (2012). A balance between stiffness and elasticity provides a mechanical foundation for the infectivity of a virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 12028-12033.

Bocanegra, R., Rodríguez-Huete, A., Fuertes, M.A., and Mateu, M.G. (2012). Molecular recognition in the human immunodeficiency capsid and antiviral design. *Virus Res.* 169, 388-410.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Milagros Castellanos Molina (2011). Aproximaciones a la obtención de cápsidas más estables del virus de la fiebre aftosa y estudio de la generación de mutaciones compensatorias. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Mauricio G. Mateu.

Rebeca Bocanegra Rojo (2011). Ensamblaje in vitro de la cápsida del virus de la inmunodeficiencia humana, y su inhibición por péptidos diseñados racionalmente. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Mauricio G. Mateu.

Verónica Rincón Forero (2012). Relaciones estructura-función en la cápsida del virus de la fiebre aftosa: algunas implicaciones para el desarrollo de vacunas y antivirales. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Mauricio G. Mateu.

Otras actividades / Other activities

Mauricio G. Mateu, miembro del Editorial Board de Virus Research.

Mauricio G. Mateu, editor del libro "Structure and Physics of Viruses", Springer SBM, Holanda (publicación en 2013).

Mauricio G. Mateu, member of the Editorial Board of Virus Research.

Mauricio G. Mateu, editor of the book "Structure and Physics of Viruses", Springer SBM, The Netherlands (to be published in 2013).

Efectos de elementos extracromosómicos sobre el comportamiento de su huésped *Bacillus* y mecanismos de transferencia génica horizontal en *Bacillus*

Effects of extrachromosomal elements on behaviour of its host and mechanisms of horizontal gene transfer in Bacillus



Jefe de Línea / Group Leader:
Wilfried J.J. Meijer

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Praveen K. Singh
Gayetri Ramachandran
Esther Serrano

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Lucía Durán Alcalde

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Andrés Miguel Arribas
Miguel Fernández Huerta
César Gago Córdoba

Resumen de investigación

Los elementos genéticos móviles (MGE) (fagos, plásmidos, transposones e "ICEs"), se pueden transferir horizontalmente entre células bacterianas afectando a la composición genética y por tanto, a su comportamiento. En consecuencia, la transferencia genética horizontal (HGT) tiene un papel crucial en la evolución microbiana, así como importantes implicaciones en una gran variedad de problemas tanto a nivel de salud ambiental como pública. Por ejemplo, la "HGT" es la principal responsable de la aparición y rápida dispersión de la resistencia a los antibióticos.

Se sabe poco, especialmente en bacterias Gram-positivas, acerca de los mecanismos por los cuales los "MGE" ejercen sus efectos sobre el comportamiento de su hospedador ó en la regulación de su movilidad. Una mejor comprensión del tema es crucial para hacer frente a importantes amenazas. Estudiamos estas cuestiones utilizando como bacteria hospedadora *Bacillus subtilis* y como "MGE" plásmidos y fagos.

Trabajamos con *B. subtilis* porque (i) probablemente es la bacteria Gram-positiva mejor estudiada, (ii) no es patógena, (iii) es susceptible a la manipulación genética, y (iv) porque está relacionada con bacterias patógenas como *B. anthracis*, *B. cereus* y, aunque con mayor distancia filogenética, *Listeria monocytogenes*.

Nosotros hemos secuenciado y anotado los primeros dos plásmidos de *B. subtilis* y actualmente les estamos caracterizando con el objetivo de mejorar nuestro conocimiento acerca de la regulación de sus genes de movilidad y los efectos sobre su huésped.

Muchas bacterias Gram positivas tienen una gran importancia industrial o científica, no obstante, estas bacterias generalmente se resisten a una manipulación génica dirigida. Nuestro objetivo es construir vectores versátiles, basados en los sistemas de conjugación que estamos estudiando, que permitan la modificación génica de estas bacterias.

A menudo, la infección por fagos cambia el comportamiento de su huésped, sin embargo desconocemos cómo dichos fagos ejercen estos efectos. Entre nuestros objetivos se encuentra el intentar averiguar el funcionamiento de estos mecanismos, usando como sistemas modelos dos fagos.

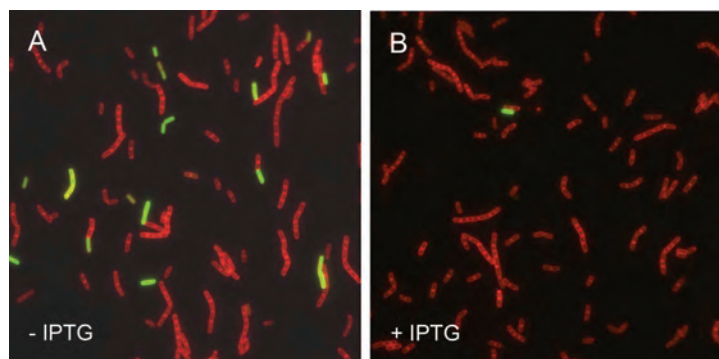


Figura 1. Efecto inhibitorio de la proteína Rok-LS20, expresado a partir de pLS20, sobre la competencia de *B. subtilis*. Las células competentes son de color verde debido a la expresión de la proteína fluorescente verde, cuyo gen está controlado por un promotor específico de la ruta de competencia. Las membranas se han teñido rojo. La cepa contiene una copia del gen rokLS20, del plásmido pLS20, bajo control de un promotor inducible por IPTG. A y B. Células sin y con inducción de la expresión de Rok-LS20.

Figure 1. Inhibitory effect of pLS20-encoded protein Rok-LS20 on competence of *B. subtilis*. Competent cells are green due to expression of the green fluorescent protein engineered to be under the control of specific competence promoter. Membranes are stained red. The strain contains a copy of the pLS20-located gene rokLS20 under the control of an IPTG-inducible promoter. A and B. Cells without and with induction of Rok-LS20.

Research summary

Mobile genetic elements (MGE), e.g. phages, plasmids, transposons and ICEs, can be transferred horizontally between cells affecting the genetic make-up and hence the behaviour of bacteria. Accordingly, horizontal gene transfer (HGT) has a crucial role in microbial evolution and has important implications in a myriad of environmental and public-health problems. For instance, HGT is mainly responsible for the emergence and dispersion of antibiotic resistance.

Little is known, especially in Gram-positive bacteria, about the transcriptional regulation of mobility genes or how MGE affects its host. A better understanding of these issues is warranted to face important threats, like antibiotic resistance. We study these issues using as host *Bacillus subtilis* and we limit the MGE to plasmids and phages.

We use *B. subtilis* because (i) it is probably the best studied Gram-positive bacterium; (ii) it is non-pathogenic; (iii) it is easy amenable to genetic manipulation; and (iv) *B. subtilis* is related to pathogenic/fastidious bacteria like *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and, although more distantly, to *Listeria monocytogenes*. So far, no sequence of conjugative *B. subtilis* plasmids was known. We have now sequenced and annotated the two large *B. subtilis* plasmids and are functionally analyzing them with the major aims to get insight in regulation of the mobility genes and effect on their host.

Many Gram positive bacteria with industrial or scientific importance are reluctant to genetic manipulation. Our goal is to construct versatile vectors allowing easy genetic manipulation of such bacteria based on the conjugation systems we study. For this we study several additional aspects of the conjugative plasmids.

Upon infection, phages often drastically alter the behaviour of *B. subtilis*. However, neither sequence nor mechanistic information of how these phages exert their effects is known. We are attempting to understand the mechanism underlying these alterations using two temperate phages as model systems.

Publicaciones / Publications

Singh, P. K., Ramachandran, G., Durán-Alcalde, L., Alonso, C. Wu, L.J., and Meijer, W.J.J. (2012) Inhibition of *Bacillus subtilis* natural competence by a native, conjugative plasmid-encoded comK repressor protein. *Environ. Microbiol.* **14**, 2812-25

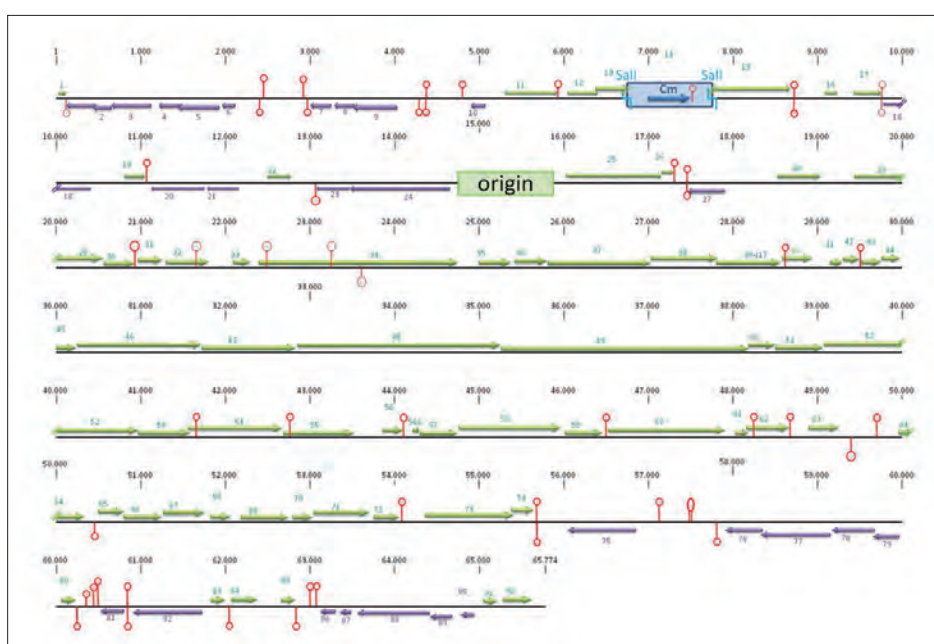


Figura 2. Mapa genético del plásmido conjugativo pLS20 de *B. subtilis*.

Figure 2. Genetic map of *B. subtilis* conjugative plasmid pLS20.

Retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana y terapia antirretroviral

Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and antiretroviral therapy



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Luis Menéndez Arias

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Mar Álvarez García
Tania Matamoros Grande

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Verónica Barrioluengo Fernández
Gilberto J. Betancor Quintana

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Barbara Marcelli
Mireya Rodrigo Cano
Alba Sebastián Martín

Resumen de investigación

Actualmente, el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) se basa en la utilización de fármacos que bloquean diversas etapas de su ciclo vital. Los inhibidores de la retrotranscriptasa (RT) constituyen la base de los tratamientos actuales más utilizados y eficaces. La RT del VIH-1 es la enzima responsable de la replicación de su ARN genómico. El VIH-1 tiene una elevada tasa de mutación ($\sim 10^{-4}$ a 10^{-5} mutaciones por nucleótido y ciclo de replicación), lo que favorece la aparición de cepas resistentes y el consiguiente fracaso terapéutico. La RT contribuye a la enorme variabilidad del VIH debido a que se trata de una polimerasa de ADN que carece de actividad correctora de errores.

Nuestros esfuerzos en los últimos años se han dirigido hacia la consecución de dos objetivos importantes: (1) entender el papel que juegan distintos aminoácidos en la especificidad de nucleótido y en la fidelidad de copia de la enzima; y (2) determinar cuáles son los mecanismos moleculares implicados en resistencia a inhibidores de la RT. En el laboratorio hemos caracterizado combinaciones de mutaciones poco comunes y que aparecen en pacientes que han sido tratados con múltiples fármacos inhibidores de la RT, y hemos identificado el mecanismo por el que mutaciones secundarias contribuyen a la selección de cepas resistentes a diversos tratamientos.

Por otro lado, se han obtenido variantes de la RT derivadas de aislados del VIH-1 de grupo O, que presentan elevada estabilidad térmica y actividad a altas temperaturas. Estas polimerasas pueden ser útiles en biología molecular para estudios de expresión génica. Proyectos futuros incluyen estudios de otras RTs de retrovirus y polimerasas virales, análisis de posibles interacciones entre RT y proteínas virales o de la célula hospedadora e investigaciones sobre mecanismos celulares de defensa innata frente a la infección por el VIH.

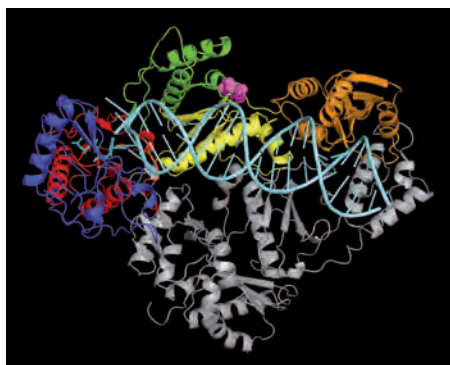


Figura 1. Estructura cristalográfica de la retrotranscriptasa del VIH-1 unida a un complejo molde-iniciador de ADN/ADN y dTTP, en la que se muestra el residuo Arg²⁸⁴ (esferas moradas) en el subdominio "thumb" de la subunidad p66 (Betancor et al., 2012. *Retrovirology* 9: 68).

Figure 1. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with a DNA/DNA template-primer and dTTP, showing the location of Arg²⁸⁴ (purple spheres) in the thumb subdomain of p66 (Betancor et al., 2012. *Retrovirology* 9: 68).

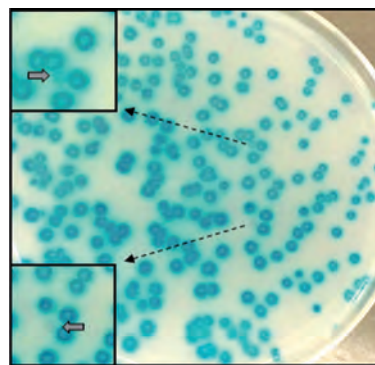


Figura 2. Detección de mutantes utilizando el ensayo de fidelidad basado en la expresión de *lacZα* en M13mp2. Se ilustra la identificación de placas azul claro o incolores, portadoras de mutaciones introducidas en la reacción de síntesis catalizada por polimerasas de ADN (RTs purificadas).

Figure 2. Detection of mutants with the M13mp2 *lacZα* forward mutation assay. Identification of light blue/colorless plaques harboring mutations introduced in the DNA polymerization reaction, carried out with purified RT.

Research summary

Current therapies against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection are based on the use of antiretroviral drugs targeting different steps of the viral life cycle. HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibitors constitute the backbone of the most popular and effective treatments. The HIV-1 RT is the enzyme responsible for the replication of the viral genome, composed of two copies of single-stranded RNA. HIV-1 has a high mutation rate ($\sim 10^{-4}$ - 10^{-5} mutations per nucleotide and cycle of replication) that favors the emergence of drug-resistant strains and eventually leads to therapy failure. The RT contributes to the enormous variability of HIV-1 because the RT is a DNA polymerase lacking proof-reading activity.

During the last few years our efforts have been directed towards: (1) understanding the role of different amino acids in the nucleotide specificity of the enzyme, as well as in its fidelity of DNA synthesis; and (2) the elucidation of molecular mechanisms involved in RT inhibitor resistance. In our laboratory, we have characterized complex mutational patterns that appear in heavily-treated patients that do not respond to antiretroviral therapy. We have also identified mechanisms by which secondary mutations contribute to the selection of drug-resistant strains during treatment with frequently used combinations of RT inhibitors.

On a different project, we have described RT variants derived from an HIV-1 group O strain that show increased thermal stability and retain polymerase activity at temperatures above 50°C. Some of these engineered RTs are active at high temperatures and show remarkable fidelity of DNA synthesis. The characterized RTs are being developed into useful tools to study gene expression. Future projects include the characterization of other retroviral RTs and viral polymerases, studies on the interaction of between the HIV-1 RT and viral and host proteins, and research on innate intracellular blocks to HIV infection.

Publicaciones / Publications

Barrioluengo, V., Álvarez, M., Barbieri, D., and Menéndez-Arias, L. (2011) Thermostable HIV-1 group O reverse transcriptase variants with the same fidelity as murine leukaemia virus reverse transcriptase. *Biochem. J.* **436**, 599-607.

Kisic, M., Matamoros, T., Nevot, M., Mendieta, J., Martínez-Picado, J., Martínez, M. A., and Menéndez-Arias, L. (2011) Thymidine analogue excision and discrimination modulated by mutational complexes including single amino acid deletions of Asp-67 or Thr-69 in HIV-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **286**, 20615-20624.

Jegede O., Khodyakova A., Chernov M., Weber, J., Menéndez-Arias, L., Gudkov, A., and Quiñones-Mateu M. E. (2011) Identification of low-molecular weight inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase using a cell-based high-throughput screening system. *Antiviral Res.* **91**, 94-98.

Paredes, R., Puertas, M. C., Bannister, W., Kisic, M., Cozzi-Lepri, A., Pou, C., Bellido, R., Betancor, G., Bogner, J., Gargalianos, P., Bánhegyi, D., Clotet, B., Lundgren, J., Menéndez-Arias, L., Martínez-Picado, J., and The EuroSIDA Study Group (2011) A376S in the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase confers increased risk of virological failure to nevirapine therapy. *J. Infect. Dis.* **204**, 741-752.

Menéndez-Arias, L. (2011) Evidence and controversies on the role of XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Rev. Med. Virol.* **21**, 3-17.

Matamoros, T., Álvarez, M., Barrioluengo, V., Betancor, G., and Menéndez-Arias, L. (2011) Reverse transcriptase and retroviral replication. In: Kušić-Tišma, J. (ed) *DNA replication and related cellular processes*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 111-142. Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/reverse-transcriptase-and-retroviral-replication>.

Menéndez-Arias, L., Betancor, G., and Matamoros, T. (2011) HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations involved in resistance to approved non-nucleoside inhibitors. *Antiviral Res.* **92**, 139-149.

Menéndez-Arias, L. (2011) A structural frame for understanding the role of thymidine analogue resistance mutations in resistance to zidovudine and other nucleoside analogues. *Antivir. Ther.* **16**, 943-946.

Barrioluengo, V., Wang, Y., Le Grice, S. F. J., and Menéndez-Arias, L. (2012) Intrinsic DNA synthesis fidelity of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *FEBS J.* **279**, 1433-1444.

Betancor, G., Garriga, C., Puertas, M.C., Nevot, M., Anta, L., Blanco, J. L., Pérez-Ellás, M. J., de Mendoza, C., Martínez, M. A., Martínez-Picado, J., and Menéndez-Arias, L., for the Resistance Platform of the

Spanish AIDS Research Network (ResRIS) (2012) Clinical, virological and biochemical evidence supporting the association of HIV-1 reverse transcriptase polymorphism R284K and thymidine analogue resistance mutations M41L, L210W and T215Y in patients failing tenofovir/emtricitabine therapy. *Retrovirology* **9**, 68.

Clotet, B., Menéndez-Arias, L., Schapiro, J. M., Kuritzkes, D., Burger, D., Rockstroh, J., Soriano, V., Telenti, A., Brun-Vezinet, F., Geretti, A. M., Boucher, C. A., and Richman, D. D. (eds.) (2012) *The HIV & Hepatitis Drug Resistance and PK Guide*. Twelfth Edition. Fundació de Lluita contra la SIDA, Barcelona, Spain, 676 pp. Available from: <http://www.fl sida.org/theguide>.

Otras actividades / Other activities

Luis Menéndez Arias es miembro de los Comités Editoriales de *Antiviral Research*, *Antiviral Therapy*, *Viruses*, *Virus Research*, *World Journal of Translational Medicine* y *World Journal of Virology* / Member of the Editorial Boards of *Antiviral Research*, *Antiviral Therapy*, *Viruses*, *Virus Research*, *World Journal of Translational Medicine* and *World Journal of Virology*.

Editor académico de las revistas *Sequencing* y *PLoS ONE* / Academic editor of the journals *Sequencing* and *PLoS ONE*.

Miembro del comité de formación de la Red de Investigación en SIDA (RIS) y co-organizador de las 5ª y 6ª reuniones docentes de la Red (Sevilla, 8-11 de noviembre de 2011 y Toledo, 27-30 de noviembre de 2012) / Member of the formation and training panel of the Spanish AIDS Research Network, and co-organizer of its 5th and 6th training symposiums (Seville, November 8-11, 2011 and Toledo, November 27-30, 2012)

Patentes / Patents

L. Menéndez Arias, T. Matamoros, M. Álvarez. Retrotranscriptasa del VIH-1 de grupo O modificada. Ref.: PCT/ES2010/070320 [WO2010130864 (A1), Nov 18, 2010]. Spain. Awarded on Sept. 13, 2012 (owner: C.S.I.C.).

L. Menéndez Arias, V. Barrioluengo, M. Álvarez (2011). Nuevas retrotranscriptasas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 grupo O. Ref.: PCT/ES2011/070801 [WO2012080541 (A1), June 21, 2012] (submitted by C.S.I.C.). Spain.

Virus de la peste porcina Africana

African swine fever virus



Jefe de Línea / *Group Leader:*
María Luisa Salas Falgueras

Becarios Predoctorales /
Predoctoral Fellows:
Marina del Rosal Macías

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
María José Bustos Sánchez

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Paula López Monteagudo

Resumen de investigación

Durante la fase temprana de la infección con el virus de la peste porcina africana (VPPA), hemos observado una ruptura de la organización nuclear, que incluye un aumento en la fosforilación de la lamina A/C, seguido por ruptura de la red de lamina próxima a los sitios donde el genoma viral inicia su replicación en el núcleo, y una redistribución de otras proteínas nucleares, tales como la RNA polimerasa II, el marcador SC-35 de sitios de "splicing" y el marcador nucleolar B-23. Estos resultados, junto con la defosforilación y degradación subsiguiente de la RNA polimerasa II, sugieren la existencia de mecanismos sofisticados que actúan para regular la maquinaria nuclear durante la infección viral.

Hemos desentrañado el mecanismo de regulación redox de la proteasa del VPPA que cataliza el procesamiento de las poliproteínas virales, que es esencial para la maduración de la partícula viral. Mediante mutaciones sistemáticas a serina de las cisteínas de la proteasa y análisis proteómico identificamos dos puentes disulfuro intramoleculares que son esenciales para la función de la proteasa. Además, la cisteína catalítica es susceptible a oxidación irreversible a ácidos sulfínico y sulfónico, con pérdida de actividad. La presencia de formas oxidadas y reducidas de la proteasa en células infectadas sugiere que estos mecanismos redox pueden operar regulando la actividad de la proteasa viral durante el ciclo infectivo.

Nuestros estudios sobre la morfogénesis del virus muestran que es posible generar recombinantes del VPPA deficientes en replicación mediante la expresión inducible de ciertos genes requeridos para el ensamblaje del virus y encapsidación del genoma, lo que abre la posibilidad de su uso para el desarrollo de vacunas contra la peste porcina africana, situando genes virales bajo el control de un promotor inducible.

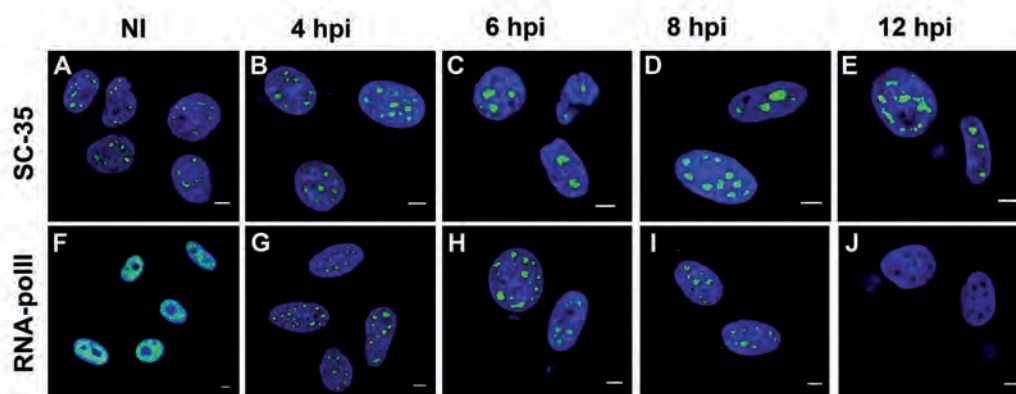


Figura 1. Redistribución de marcadores nucleares de transcripción durante la infección con VPPA. Detección intranuclear de sitios de "splicing" (SC-35) y de la RNA pol II en células Vero no infectadas (NI) o infectadas (4-12 hpi).

Figure 1. Redistribution of transcriptionally related nuclear markers during ASFV infection. Intranuclear detection of splicing speckles (SC-35) and RNA Pol II in Vero cells uninfected (NI) and infected (4-12 hpi) with ASFV.

Research summary

During the initial phase of African swine fever virus (ASFV) infection, we have observed a disruption of nuclear organization, including an increment of lamin A/C phosphorylation, followed by the disassembling of the lamina network close to the sites where the viral genome starts its replication in the nucleus, and a redistribution of other nuclear proteins, such as the RNA polymerase II, the SC-35 marker of splicing sites and the nucleolar B-23 marker. These findings, together with the dephosphorylation and subsequent degradation of RNA polymerase II, suggest the existence of sophisticated mechanisms to regulate the nuclear machinery during infection.

We have unraveled the mechanism of redox regulation of the ASFV protease that catalyzes the processing of the viral polyproteins, which is essential for virus maturation. By carrying out systematic mutations to serine of the protease cysteines and by performing a proteomic analysis we identified two intramolecular disulfide bonds that are essential for protease function. Furthermore, the catalytic cysteine is prone to irreversible oxidation to sulfinic and sulfonic acids, with loss of activity. The presence of oxidized and reduced forms of the protease in infected cells suggests that these redox mechanisms may operate regulating the activity of the viral protease during the infective cycle.

Our studies on virus morphogenesis show that it is possible to produce replication deficient ASFV strains by the conditional expression of certain genes required for virus assembly and genome encapsidation, opening the possibility of their use for the development of vaccines against African swine fever, by placing viral genes under the control of an inducible promoter.

Publicaciones / Publications

Redrejo-Rodríguez, M., Rodríguez, J. M., Salas, J., and Salas, M. L. (2011) Repair of viral genomes by base excision pathways: African swine fever virus as a paradigm. In: Storici, F. (ed) *DNA Repair-On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*. ISBN 978-307-649-2. InTech Publisher. Chapter 5, pp. 79-96.

Ballester, M., Rodríguez-Cariño, C., Pérez, M., Gallardo, C., Rodríguez, J. M., Salas, M. L.^a, and Rodríguez, F.^a (2011) Disruption of nuclear organization during the initial phase of African swine fever virus infection. *J. Virol.* **85**, 8263-8269. ^a Both authors contributed equally to this work.

Dixon, L. K., Alonso, C., Escribano, J. M., Martins, C., Revilla, Y., Salas, M. L., and Takamatsu, H. (2012) Asfarviridae. In: King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. and Lefkowitz, E. J. (ed) *Virus Taxonomy*, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Inc. pp. 153-162.

Windsor, M., Hawes, P., Monaghan, P., Salas, M. L., Rodríguez, J. M., and Wileman, T. (2012) Mechanism of collapse of endoplasmic reticulum cisternae during African swine fever virus infection. *Traffic* **13**, 30-42.

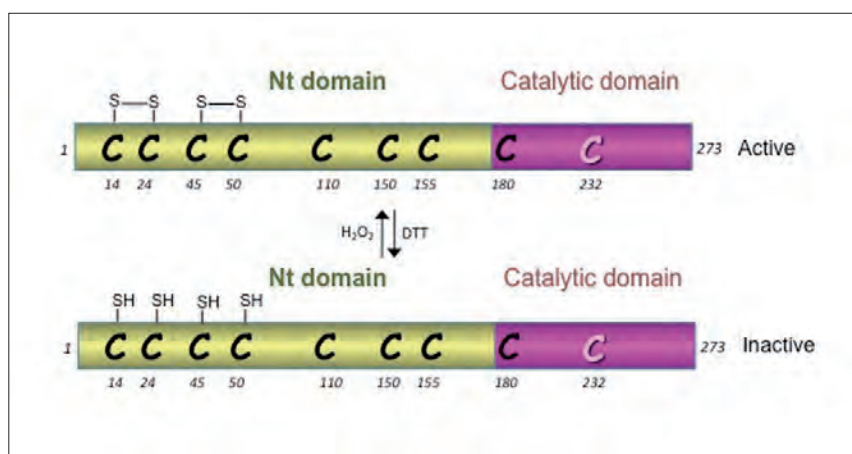


Figura 2. Regulación redox de la proteasa que procesa las poliproteínas del VPPA. Dos puentes disulfuro intramoleculares controlan la actividad de la proteasa.

Figure 2. Redox regulation of the ASFV polyprotein processing protease. Two intramolecular disulfide bonds control the activity of the protease.

Desarrollo de nuevas estrategias para el control y prevención de enfermedades virales: el virus de la fiebre aftosa como modelo

New strategies for prevention and control of viral diseases: foot-and-mouth disease virus as a model



Jefe de Línea / Group Leader:
Francisco Sobrino

Personal Científico /
Scientific Staff:
Margarita Sáiz

Postdoctorales/ Postdoctoral Fellows:
María Flora Rosas
Mónica González Magaldi
Miguel Rodríguez
Miguel Ángel Martín

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
María Teresa Sánchez
Yuri A. Vieira

Ángela Vázquez
Flavia Caridi

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Adriana Sanz
Fabio Antenucci

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Belén Borrego (CISA-INIA)

Resumen de investigación

El virus de la fiebre aftosa (VFA) constituye un interesante modelo, de gran importancia económica, para entender como las interacciones entre un virus con gran capacidad de variación y sus diferentes hospedadores naturales condicionan el control de la enfermedad que produce. Se trabaja en el desarrollo de nuevas vacunas marcadoras frente al VFA que induzcan respuestas humorales y celulares protectoras - empleando como principal modelo un importante hospedador natural del VFA: el cerdo - y en el análisis de su inmunogenicidad. Algunas de estas estrategias están siendo empleadas para el desarrollo de nuevas vacunas frente a otra importante enfermedad viral animal, la peste porcina clásica (PPC). Se trabaja, también, en el análisis funcional de distintas proteínas virales en la internalización, el ciclo de multiplicación y la patogénesis molecular del VFA y de otros virus que causan enfermedades vesiculares similares, como el virus de la enfermedad vesicular del cerdo (VEVC) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV), tanto en cultivos celulares como en modelos animales. Se presta especial atención a la implicación de proteínas no estructurales en la virulencia y el rango de hospedador virales, mediante el estudio de sus interacciones con diferentes componentes celulares. Se está llevando también un estudio de las implicaciones funcionales de regiones no codificantes del ARN viral, entre otras su capacidad para inducir respuestas inmunes innatas y su uso potencial, fuera del contexto del RNA viral, como elementos antivirales e inmunomoduladores. Además de información básica sobre el ciclo de multiplicación de estos virus, los resultados obtenidos están siendo empleados para la identificación de dianas antivirales y determinantes de atenuación viral, así como para el desarrollo de nuevas estrategias vacunales y antivirales. Como parte de estos estudios se está caracterizando la capacidad del ácido valproico para inhibir la multiplicación de diferentes virus con envoltura. Parte de este trabajo ha sido desarrollado en las instalaciones BSL3 del CISA-INIA.

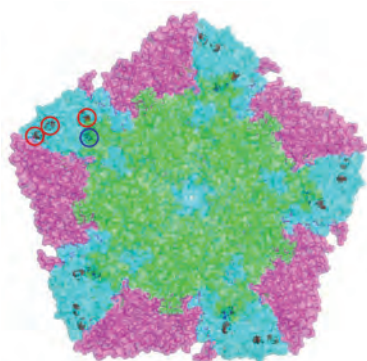


Figura 1. Representación de una subunidad pentamérica de la cápsida del VFA mostrando la posición de mutaciones que incrementan (rojo) o reducen (azul) la sensibilidad frente a pH ácido de la partícula viral. VP1 verde, VP2 en magenta, VP3 en cyan.

Figure 1. Diagram showing a FMDV pentameric capsid subunit, including mutations that increase (red) or reduce (blue) the acidic pH sensitivity of viral particle. VP1 green, VP2 magenta, VP3 cyan.

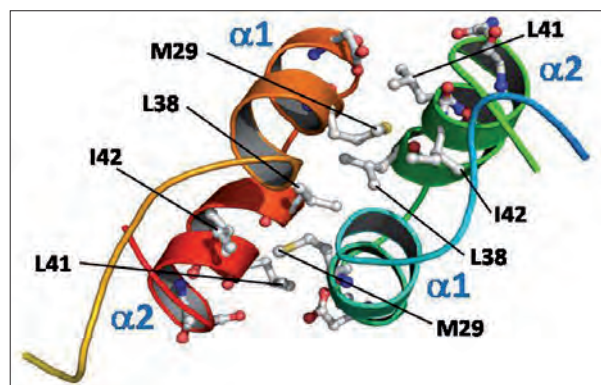


Figura 2. Modelado molecular del dímero establecido entre la región NH2-terminal de dos moléculas de la proteína 3A del VFA. Se indican los residuos cuya contribución a la dimerización, mediante la estabilización de la interfaz hidrofóbica que media esta interacción, ha sido comprobada experimentalmente.

Figure 2. Structural model for the dimer established between the N-ter of two FMDV 3A proteins. Residues participating in the hydrophobic interface, whose contribution to dimer stability has been experimentally tested, are indicated.

Research summary

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is one of the major concerns for animal health. It is also an interesting model system for understanding the interactions of a highly variable virus and its natural hosts and the implications of these interactions on disease control. We are working in the development of new FMDV marker vaccines that can induce protective humoral and cellular immune responses, using the pig, an important natural host, as an animal model. Some of these strategies are also being applied to the development of new vaccines against classical swine fever (CSF). We are also analyzing the functional role of FMDV proteins on the internalization, the replication cycle and the mechanisms mediating the pathogenesis of FMDV and other related viruses causing vesicular diseases, such as swine vesicular disease virus (SVDV), and vesicular stomatitis virus (VSV) in cultured cells and in animal models. Special attention is being paid to the functional implications of non-structural proteins, like those from the FMDV 3AB region, in virus virulence and host range. A parallel study of the functional implications of non-coding RNA regions is also being conducted, in particular their capacity to elicit innate immune responses and their potential use as antiviral and immunomodulatory elements after delivery as synthetic RNA transcripts. Besides providing basic information on the multiplication cycle of these viruses, the results obtained are being used for the identification of antiviral targets, attenuation determinants as well as the design of new vaccine strategies. As part of these studies, we are characterizing the inhibitory effect of valproic acid on the multiplication of enveloped viruses. Part of the work has been performed in the BSL3 facilities at CISA-INIA.

Publicaciones / Publications

Monsó, M., Tarradas, J., de la Torre, B.G., Sobrino, F., Ganges, L., and Andreu, D. (2011) Peptide vaccine candidates against classical swine fever virus: T cell and neutralizing antibody responses of dendrimers displaying E2 and NS2-3 epitopes. *J. Pept. Sci.* **17**, 24-31.

Vázquez-Calvo, A., Saiz, J.C., Sobrino, F., and Martín-Acebes, M.A. (2011) Inhibition of enveloped virus infection of cultured cells by valproic acid. *J. Virol.* **85**, 1267-1274.

Martín-Acebes, M., Vázquez-Calvo, A., Rincón, V., Mateu, M.G., Sobrino, F. (2011) A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid resistance. *J. Virol.* **85**, 2733-2740.

Ganges, L., Borrego, B., Fernández-Pacheco, P., Revilla, C., Domínguez-Juncal, J., Fernández-Borges, N., Sobrino, F., and Rodríguez, F. (2011) DNA immunization of pigs with foot-and mouth disease virus minigenes: from partial protection to disease exacerbation. *Virus Res.* **157**, 121-125.

Tarradas, J., Monsó, M., Muñoz, M., Rosel, R., Fraile, L., Mora, M., Muñoz, I., Andreu, D., Sobrino, F. and Ganges, L. (2011) Partial protection against classical swine fever virus elicited by dendrimeric vaccine-candidate peptide in domestic pigs. *Vaccine* **29**, 4422-4429.

Rodríguez-Pulido, M., Borrego, B., Sobrino, F. and Saiz, M. (2011) RNA structural domains in non-coding regions of foot-and-mouth disease virus genome trigger innate immunity in porcine cells and mice. *J. Virol.* **85**, 6492-6501.

Tarradas, J., Alvarez, B., Fraile, L., Rosell, R., Muñoz, M., Galindo-Cardiel, L., Domingo, M., Domínguez, J., Ezquerro, A., Sobrino, F. and Ganges, L. (2011) Adjuvant effect of swine ccl20 chemokine in DNA vaccination against CSFV. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **142**, 243-251.

Borrego, B., Argilague, J.M., Pérez-Martín, E., Pérez-Filgueira, M., Escribano, J.M., Sobrino, F., and Rodríguez, F. (2011) A DNA vaccine encoding foot-and-mouth disease virus epitopes targeted to class II swine leukocyte antigens can protect pigs against viral challenge. *Antiviral Res.* **92**, 359-63.

Rodríguez-Pulido, M., Sobrino, F., Borrego, B. and Saiz, M. (2011) Inoculation of newborn mice with non-coding regions of foot-and-mouth disease virus RNA can induce a rapid, solid and wide-range protection against viral infection. *Antiviral Res.* **92**, 500-504.

Martín-Acebes, M.A., Vázquez-Calvo, A., González-Magaldi, M. and Sobrino, F. (2011) Foot-and-mouth disease virus particles inactivated with binary ethylenimine are efficiently internalized into cultured cells. *Vaccine* **29**, 9655-9662.

Cubillos, C., Avalos, I., de la Torre, B., Bárcena, J., Andreu, D., Sobrino, F. and Blanco, E. (2012) Inclusion of a specific T cell epitope increases the protection conferred against foot-and-mouth disease virus in pigs by a linear peptide containing an immunodominant B cell site. *Virology J.* **9**, 66.

Vázquez-Calvo, A., Saiz, J.C., McCullough, K., Sobrino, F. and Martín-Acebes, M.A. (2012) Acid-dependant virus entry. *Virus Res.* **167**, 125-137.

Fajardo, T., Rosas M.F., Sobrino, F. and Martínez-Salas, E. (2012) Exploring IRES region accessibility by interference of foot-and-mouth disease virus infectivity. *PLoS ONE*, **7**(7): e41382. doi:10.1371/journal.pone.0041382.

González-Magaldi, M., Postigo, R., de la Torre, B.G., Vieira, Y.A., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Andreu, D., Kremer, L., Rosas, M. F. and Sobrino, F. (2012) Mutations that hamper dimerization of foot-and-mouth disease virus 3A protein are detrimental for infectivity. *J. Virol.* **86**, 11013-11023.

Vázquez-Calvo, A., Caridi, F., Rodríguez-Pulido, M., Borrego, B., Saiz, F., Sobrino, F. and Martín-Acebes, M.A. (2012) Modulation of foot-and-mouth disease virus pH threshold for uncoating correlates with differential sensitivity to inhibition of cellular Rab GTPases and decreases infectivity in vivo. *J. Gen. Virol.* **93**:2382-2386.

Vázquez-Calvo, A., Sobrino, F., and Martín-Acebes, M.A. (2012) A role for plasma membrane phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate in the internalization of foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus. *PLoS ONE*, **7**(9): e45172. doi:10.1371/journal.pone.0045172.

Tarradas, J., Monsó, M., Fraile, L., de la Torre, B.G., Muñoz, M., Rosel, R., Riquelme, C., Pérez, L.J., Nofrías, M., Domingo, M., Sobrino, F., Andreu, D. and Ganges, L. (2012) A cell epitope on NS3 non-structural protein enhances the B and T cell responses elicited by dendrimeric constructions against CSFV in domestic pigs. *Vet Immunol. Immunopathol.* **150**: 36-46.

Rodríguez-Pulido, M., Martín-Acebes, M.A., Escribano-Romero, E., Blázquez A.B., Sobrino, F., Borrego, B., Saiz, M., and Saiz, J.C. (2012) Full protection against West Nile virus (WNV) infection in mice after inoculation with type I- inducing RNA transcripts. *PLoS ONE* **7**(11): e49494.

Patentes / Patents

A. Vazquez, F. Sobrino, M.A. Martín y J.C. Saiz. Uso del ácido valproico como antiviral contra virus con envoltura. P 200602142. España (29 de marzo 2010). CSIC-INIA.

M. Saiz, F. Sobrino, B. Borrego, M. Rodríguez, J.C. Saiz y M.A. Martín. Uso de una región no codificante del genoma del virus de la fiebre aftosa para la elaboración de un medicamento antiviral. P201130445. España (25 de marzo 2011). PCT solicitada el 25/3/2012 (PCT ES 2012/070198). CSIC-INIA.

C. Cubillo, E. Blanco, J. Bárcena, F. Sobrino y D. Andreu. Peptide vaccines for the prevention of foot-and-mouth disease. P8244EP00. Patente Europea (2 de marzo de 2012). UPF, CSIC, INIA.

Tesis doctorales / Doctoral theses

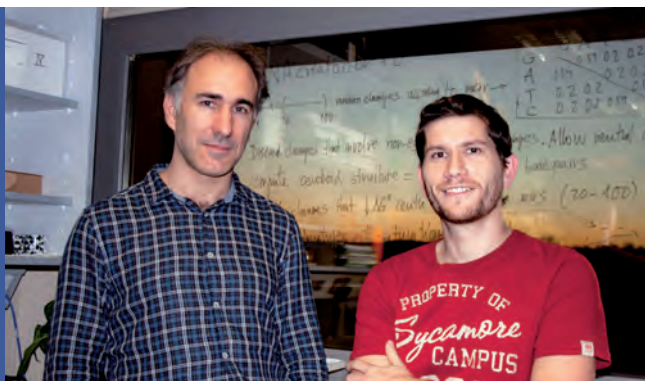
María Teresa Sánchez Aparicio (2010). Estudio de proteínas no estructurales del virus de la fiebre aftosa: análisis funcionales y aplicación al diagnóstico viral. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: M.F. Rosas y F. Sobrino.

Mónica González Magaldi (2012). Caracterización de la proteína 3A del virus de la fiebre aftosa. Estudio de su dimerización, capacidad de unión a membranas y dinámica celular. Director: F. Sobrino.

Angela Vázquez Calvo (2012). Estudio de los requerimientos para la entrada del virus de la fiebre aftosa en cultivos celulares y caracterización de ácido valproico como compuesto antiviral. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: M.A. Martín Acebes y F. Sobrino (CBMSO).

Estructura del mRNA y control traduccional en sistemas biológicos

mRNA structure and translational control in Biological Systems



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Iván Ventoso

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
René Toribio

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Irene Díaz

Resumen de investigación

Nuestra línea de investigación se consolidó como independiente en 2011, y desde entonces hemos profundizado en los aspectos estructurales, funcionales y evolutivos de la traducción en sistemas eucarióticos durante la respuesta al estrés. La inactivación transitoria del factor de traducción eIF2 por fosforilación juega un papel fundamental en la remodelación traduccional en respuesta al estrés, bloqueando la traducción de la mayoría de los mRNA celulares y activando al mismo tiempo la traducción de un grupo de mRNAs implicados en la respuesta al estrés. Existe una importante conexión entre la respuesta al estrés y la respuesta antiviral en mamíferos, de modo que muchos virus han desarrollado estrategias traduccionales para superar esta respuesta y colonizar nuevos hospedadores. En el laboratorio estudiamos la traducción de los mRNAs de algunos arbovirus de los géneros Alphavirus y Flavivirus como modelos biológicos de interacción parásito-hospedador, y con la intención de identificar los elementos estructurales en los mRNA que promueven la traducción independiente del factor eIF2. Nuestras principales aportaciones en los dos últimos años han sido:

- 1) La descripción cualitativa y cuantitativa de la remodelación traduccional en células humanas y murinas en respuesta al estrés de retículo endoplásmico (UPR), identificando más de 300 mRNAs cuya traducción se activa por la fosforilación de eIF2.
- 2) Hemos propuesto un escenario evolutivo que describe molecularmente cómo los Alphavirus (ej. Sindbis) pudieron adaptar la traducción de sus mRNA durante la colonización de hospedadores vertebrados en el pasado.
- 3) Estamos describiendo un mecanismo de iniciación de la traducción no canónico que opera en ciertos mRNA virales (Alphavirus y Flavivirus), y probablemente en algunos mRNA celulares (ej. ATF-4) implicados en la respuesta al estrés. Este tipo de iniciación requiere la acción de estructuras de RNA de tipo stem-loop (DLP) situadas por detrás del codón de iniciación en el mRNA.

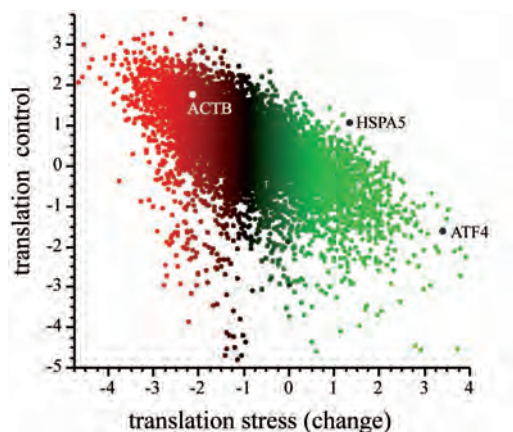


Figura 1. Remodelación del traductoma de células de ratón en respuesta al estrés. El plot muestra el cambio en la eficiencia traduccional de 10.000 mRNA tras el tratamiento con thapsigargin (estrés de retículo) de células NIH3T3. También se muestra la traducción de mRNA representativos (ACTB, HSPA5 y ATF-4).

Figure 1. Stress-induced remodeling of mouse translatoe. The plot shows the change in translation efficiencies of 10,000 mRNAs after thapsigargin treatment (RE stress) of NIH3T3 cells. Translation changes of representative mRNAs (ACTB, HSPA5 and ATF-4) are shown.

Research summary

Working as an independent group since 2011, we are trying to describe the main structural, functional and evolutionary aspects of translation in eukaryotic systems under stress. The transient inactivation of translation factor eIF2 by phosphorylation plays a central role in translation remodeling, by blocking protein synthesis of most mRNAs and by promoting at the same time the translation of a subset of mRNA involved in stress response. An interesting connection between stress and antiviral responses has been found in mammals, so that many viruses have developed translational tricks to overcome the host response necessary for colonization and spreading. We study the translation of viral mRNA from the genus *Alphavirus* and *Flavivirus* as biological models of parasite-host interaction, trying to identify those structural elements in the mRNA that promote an eIF2-independent translation and escape to host response. Our main contributions during the last two years were:

1. We have described the translation remodeling in human and murine cells after endoplasmic reticulum stress (UPR). We have identified more than 300 mRNA whose translation was activated by eIF2 phosphorylation. Gene ontology analysis revealed that this group of mRNA is highly enriched in early response transcription factors (IEGs).
2. We have proposed an evolutionary scenario to explain in molecular terms how Alphaviruses could have adapted translation of their mRNA during the colonization of vertebrate hosts in the past.
3. By combining structural, functional and computational analysis, we are describing a non canonical mechanism of translation initiation that operates in some viral (*Alphavirus* and *Flavivirus*) and perhaps in some cellular mRNA (e.g ATF-4) involved in stress response. This mode of initiation requires the presence of RNA structures (DLP) located downstream the initiation codon.

Publicaciones / Publications

del Pino J., Jiménez JL., Ventoso I., Castelló A., Muñoz-Fernández MA., de Haro C. and Berlanga JJ. (2012) GCN2 has inhibitory effect on human immunodeficiency virus-1 protein synthesis and is cleaved upon viral infection. *PLoS One*. **7**(10), e47272.

Ventoso I. (2012) Adaptive changes in alphavirus mRNA translation allowed colonization of vertebrate hosts. *J Virol*. **86**(17), 9484-94.

Ventoso I., Kochetov A., Montaner D., Dopazo J. and Santoyo J. (2012) Extensive translome remodeling during ER stress response in mammalian cells. *PLoS One*. **7**(5), e35915.

Domingo-Gil E., Toribio R., Nájera JL., Esteban M. and Ventoso I. (2011) Diversity in viral anti-PKR mechanisms: a remarkable case of evolutionary convergence. *PLoS One*. **6**(2), e16711.

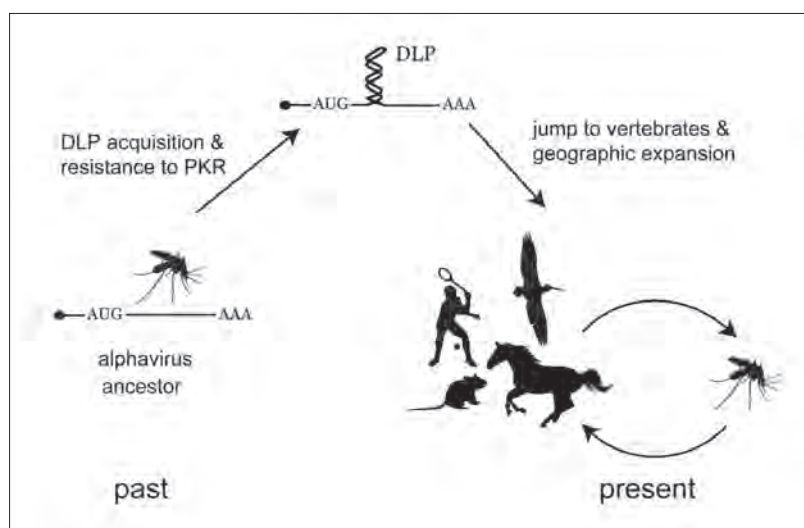
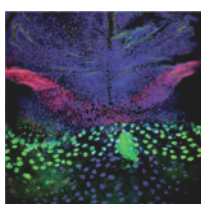
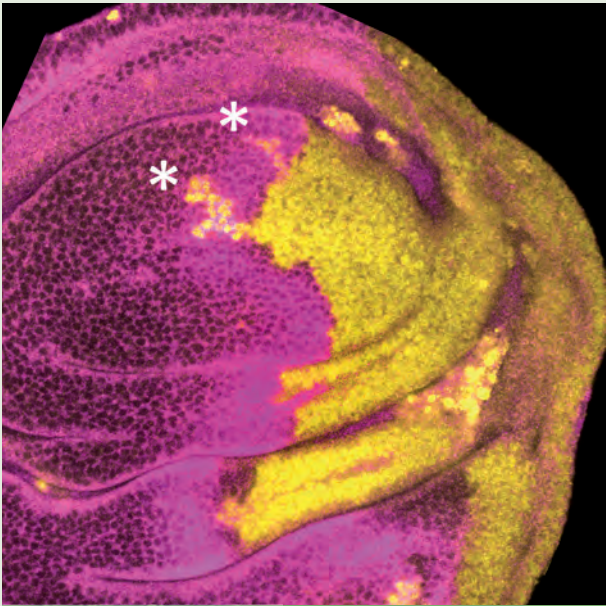


Figura 2. Un posible escenario evolutivo para explicar la historia natural de los Alphavirus. Asumiendo un ancestro que replicaba sólo en insectos, la adquisición de las estructuras DLP en los mRNA virales pudo permitir el salto y la colonización de nuevos hospedadores vertebrados.

Figure 2. An evolutionary scenario for the natural history of Alphavirus is proposed. Assuming an ancestor that only replicated in insects, the acquisition of DLP structures in viral mRNAs may have allowed the colonization of new vertebrate host and the subsequent spreading of these viruses worldwide.

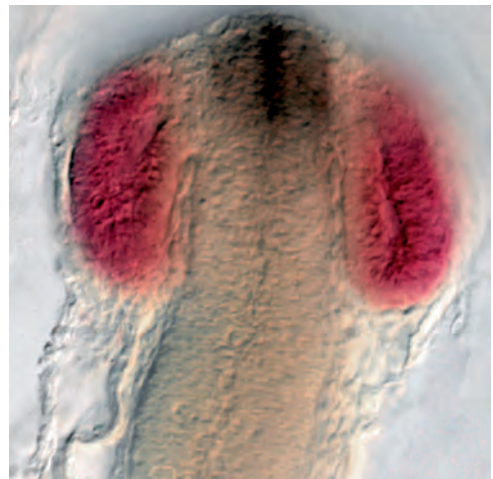
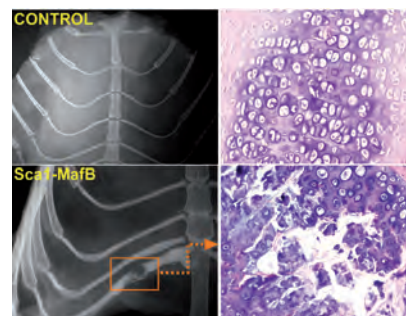
88	Factores de transcripción y la formación de heterocromatina en <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Transcription factors and heterochromatin formation in Drosophila</i> Natalia Azpiazu Torres
90	Control de la proliferación celular y regeneración mediado por señales intercelulares <i>Control of cell proliferation and organ regeneration through intercellular signals</i> Antonio Baonza Cuenca
92	Morfogénesis y Diferenciación del Sistema Nervioso de Vertebrados <i>Morphogenesis and Differentiation of the vertebrate CNS</i> Paola Bovolenta Nicolao
94	Regulación epigenética de la expresión génica durante el desarrollo de <i>Drosophila</i> <i>Epigenetic regulation of gene expression during Drosophila development</i> Ana María de Busturia Jimeno
96	Base molecular y celular de la organogénesis en <i>Drosophila</i> <i>Molecular and cellular basis of Drosophila organogenesis</i> Sonsoles Campuzano Corrales
98	Plasticidad Celular en Desarrollo y Cáncer <i>Cellular Plasticity in Development and Cancer</i> César Cobaleda Hernández
100	Análisis de la señalización celular durante el desarrollo de epitelios en <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Signalling pathways directing wing development and vein pattern formation in Drosophila</i> José F. de Celis Ibeas
102	Mecanismos de señalización en el desarrollo <i>Signaling mechanisms in development</i> Isabel Guerrero Vega
104	Especificación de destinos neuronales en el desarrollo del sistema nervioso central de <i>Drosophila</i> <i>Specification of Neuronal Identities in the Development of the Drosophila Central Nervous System</i> Fernando Jiménez Díaz-Benjumea
106	Control genético de la morfogenesis <i>Genetic control of morphogenesis</i> Ginés Morata Pérez
108	Función y mecanismo de acción de las caderinas atípicas durante el desarrollo de <i>Drosophila</i> <i>Functional analysis and molecular mechanism of atypical cadherins during Drosophila development</i> Isabel Rodríguez Enríquez
110	Genética del desarrollo de derivados mesodérmicos en <i>Drosophila</i> : sistemas muscular y de filtración <i>Developmental biology of mesoderm derivatives: muscular and systems</i> Mar Ruiz Gómez
112	Especificación segmental y formación de patrón en <i>Drosophila</i> <i>Segmental specification and pattern formation in Drosophila</i> Ernesto Sánchez-Herrero Arbide





DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN

Development and Differentiation



Factores de transcripción y la formación de heterocromatina en *Drosophila melanogaster*

Transcription factors and heterochromatin formation in Drosophila



Jefe de Línea / Group Leader:
Natalia Azpiazú Torres

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Miguel A. Zaballos

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Elise Corsetti
David Requena
Walter Cantero
Sara Mederos
Pablo Hurtado
Lucía de Andrés

Resumen de investigación

Los factores de transcripción son proteínas capaces de unir ADN y regular la transcripción de genes subsidiarios. Históricamente han sido considerados como claves durante el desarrollo en *Drosophila melanogaster* ya que están situados en la parte alta de las cascadas de regulación génica. Su función es unirse al ADN en regiones promotoras y/o enhancers para facilitar o reprimir la transcripción de sus genes diana durante el desarrollo. Nosotros hemos centrado nuestros estudios en dos tipos de factores de transcripción: los de la familia Hox-TALE *homothorax* (*hth*)/*extradenticle* (*exd*) y los de la familia Pax *eyegone* (*eyg*)/*twin of eyegone* (*toe*).

Se trata de genes con un alto grado de conservación en el Reino Animal y con múltiples funciones descritas tanto en *Drosophila* como en vertebrados. Hace unos años describimos por primera vez una función inesperada de *hth* uniéndose a secuencias satélites y facilitando su transcripción durante el desarrollo embrionario temprano en *Drosophila*. Esta transcripción es necesaria para el correcto ensamblaje de la heterocromatina constitutiva que forma los centrómeros y telómeros. En ausencia de *hth* las primeras divisiones sincitiales ocurren de manera aberrante. Hemos podido también demostrar que *Eyg/Toe*, factores que actúan siempre como represores transcripcionales, reprimen a su gen diana *wingless* (*wg*) durante el desarrollo del ojo formando una estructura heterocromática cerrada en el enhancer específico de ojo.

En vertebrados ha sido descrito en los últimos meses que los genes de la familia Pax son capaces también de unirse a secuencias satélites para regular su transcripción. Estos descubrimientos abren un campo inesperado de actuación de factores de transcripción durante el desarrollo que vas mucho más allá de la simple regulación génica conocida hasta ahora y que nosotros estamos estudiando en detalle a nivel molecular y celular.

Research summary

Transcription factors are known to be proteins capable of binding to the DNA to regulate the transcription of downstream genes. They have been considered to be key players in the development of *Drosophila melanogaster*, as they act upstream of many gene regulatory cascades. They function by binding to the DNA in promoters and/or enhancers activating or repressing their target genes. For many years, we have focused our attention in two different types of transcription factors: the Hox-TALE family of proteins Homothorax (*hth*)/Extradenticle (*exd*) and the Pax family of proteins Eyegone (*eyg*)/Twin of eyegone (*toe*).

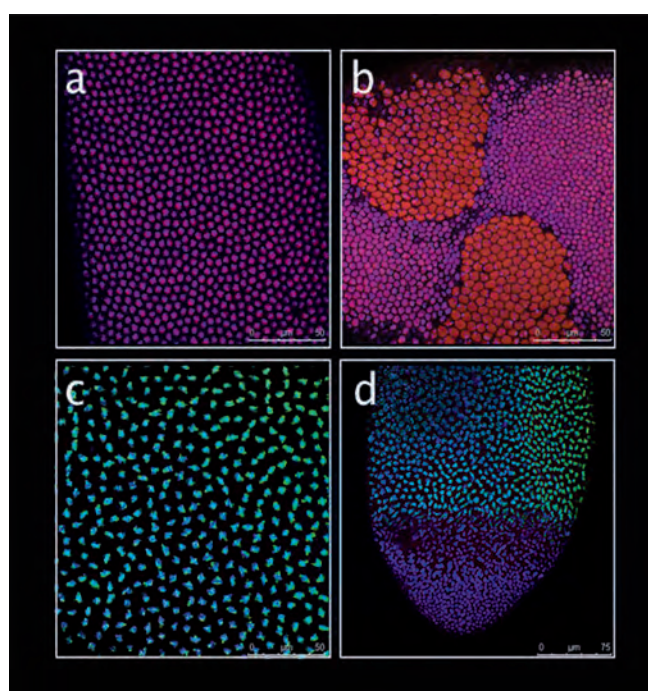
Both have homologs along the Animal Kingdom and many different functions have been described for them in *Drosophila* as well as in vertebrates. Some years ago we described for the first time an unexpected role for *hth* during the early pre-blastodermic divisions in *Drosophila*. We were able to show that *Hth* binds to satellite sequences facilitating their transcription. This transcription is essential for constitutive heterochromatin formation, that is, for correct assembly of centromeres and telomeres. In the absence of *Hth*, the rapid syncytial divisions do not occur properly. We were also able to show that *Eyg/Toe*, known transcriptional repressors during *Drosophila* development, regulate their target gene *wingless* (*wg*) by forming a closed heterochromatin like structure in its eye-enhancer. In the past months it has been shown that many Pax family members are able to bind to satellite sequences in mouse culture cells. All together this results open new and exciting avenues in the mode of action of transcription factors during development that we are currently investigating at the cellular and molecular level.

Publicaciones / Publications

Salvany, L., Requena, D., and Azpiazu, N. (2012). Functional association between Eyegone and HP1a mediates wingless transcriptional repression during development. *Mol Cell Biol* **32**:2407-2415.

Figura 1. Embrión temprano de *Drosophila*. a-b) Tinción con anti-HP1 (rojo) y topro3 (azul) para marcar los núcleos. c-d) Tinción con anti-PH3 (verde) y topro3 (azul). a, c) Embrión silvestre. Los núcleos se dividen sincrónicamente. b, d) Embrión mutante para *eyegone*. Hay una clara asincronía en las divisiones tempranas.

Figure 1. Early *Drosophila* embryo. a-b) Staining with anti-HP1 (red) and topro3 (blue) to visualize the nuclei. c-d) Staining with anti-PH3 (green) and topro3 (blue). a, c) Wild type embryo. The nuclei divide synchronously. b, d) *eyegone* mutant embryo. The early divisions occur asynchronously.



Control de la proliferación celular y regeneración mediado por señales intercelulares

Control of cell proliferation and organ regeneration through intercellular signals



Jefe de Línea / *Group Leader:*

Antonio Baonza Cuenca

Antonio García-Bellido

(Doctor ad honorem)

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Sandra Díaz García

Beatriz Pérez San Juan

Irene Andrade Zapata

Benjamin Velarde

Valentina Piras

Resumen de investigación

El tamaño final de los organismos pluricelulares depende en gran medida del número de células que los constituyen. Para ello es fundamental regular de forma precisa el proceso de división celular durante el desarrollo. Durante el desarrollo de *Drosophila* se conocen distintas rutas de señalización que están mediando esta regulación. Cambios en la actividad de estas rutas alteran los parámetros normales de división. La mayoría de los miembros de estas rutas de señalización se han conservado evolutivamente y juegan una importante función en el control de la proliferación en distintos organismos, incluidos los humanos. En humanos la alteración de la actividad de alguna de estas rutas están relacionadas con el desarrollo de tumores.

El objetivo principal de nuestro grupo es el comprender como distintas rutas de señalización controlan la progresión del ciclo celular y la división celular a través de la regulación transcripcional y/o actividad de distintos factores de transcripción durante el desarrollo de *Drosophila*. Esperamos que los conocimientos adquiridos nos sirvan para establecer modelos generales de cómo rutas inter-celulares controlan la división y que estos modelos puedan ser extrapolados a vertebrados.

Nuestros resultados indican algunas de las funciones en el control de la proliferación reguladas por rutas de señalización inter-celular están siendo mediadas por la familia de factores de transcripción de las bHLH. Parte de nuestro proyecto es establecer los mecanismos moleculares por lo que estos factores controlan la progresión del ciclo celular.

Otro problema en el cual estamos interesados es el de definir los mecanismos celulares y moleculares que operan durante la regeneración. Este proyecto tiene importantes implicaciones tanto desde el punto de vista de biología del desarrollo, como para establecer nuevas bases que ayuden a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en medicina regenerativa. Para ello, hemos desarrollado un nuevo modelo que nos permite estudiar la regeneración en condiciones fisiológicas. Utilizando este método esperamos aprovechar todas las técnicas genéticas que existen en *Drosophila* y poder ayudar a definir que mecanismos genéticos regulan la regeneración.

Research summary

The final size of multicellular organisms largely depends on the control of cell division regulated by different intercellular signals during the development. Several signalling pathways have been involved in this regulation during *Drosophila* development. Changes in the normal function of these signals cause variation in the normal parameters of cell proliferation. Interestingly, the members of most of these signalling pathways have been well conserved throughout evolution and play an important role in control of cell proliferation in a wide range of organisms, including human. Alterations in the activity of some of the human homologues of members of these signalling pathways are implicated in many cancers.

The overall goals of my group are to understand how signalling pathways control cell proliferation through the regulation of the activity and/or expression of different transcription factors during *Drosophila* development; to use this knowledge to gain insight into the general mechanisms by which extrinsic signals regulate cell division.

Our results suggest that the transcriptional repressors of the Helix-loop-Helix (HLH) family play a critical role mediating the control of cell proliferation by different signalling pathways. We are interested in to study the molecular mechanisms by which this family of proteins control normal and abnormal cell cycle progression.

Other problem in which we are interested is to understand how organ regeneration is controlled. The importance of understanding how this occurs has significance at different levels. One issue is to learn more about the normal mechanism that operate during development. Other important point is that the knowledge that we can gain about the general mechanisms that regulate regeneration may help to develop new therapeutic approach in regenerative medicine. We have developed a new method to remove a part of the wing imaginal disc inside the larva. Using this method, we can study the process of regeneration in its normal developmental context. Moreover, we can analyse the adult pattern of the regenerating structure and we can take advantage of all the genetic tools available in *Drosophila*.

Publicaciones / Publications

San Juan, B.P., Andrade-Zapata, I., and Baonza, A. (2012) The bHLH factors Dpn and members of the E(spl) complex mediate the function of Notch signalling regulating cell proliferation during wing disc development. *Biol Open*. **1**(7), 667-76.

San-Juán, B.P., and Baonza, A. (2011) The bHLH factor deadpan is a direct target of Notch signaling and regulates neuroblast self-renewal in *Drosophila*. *Dev Biol*. **352**(1), 70-82.

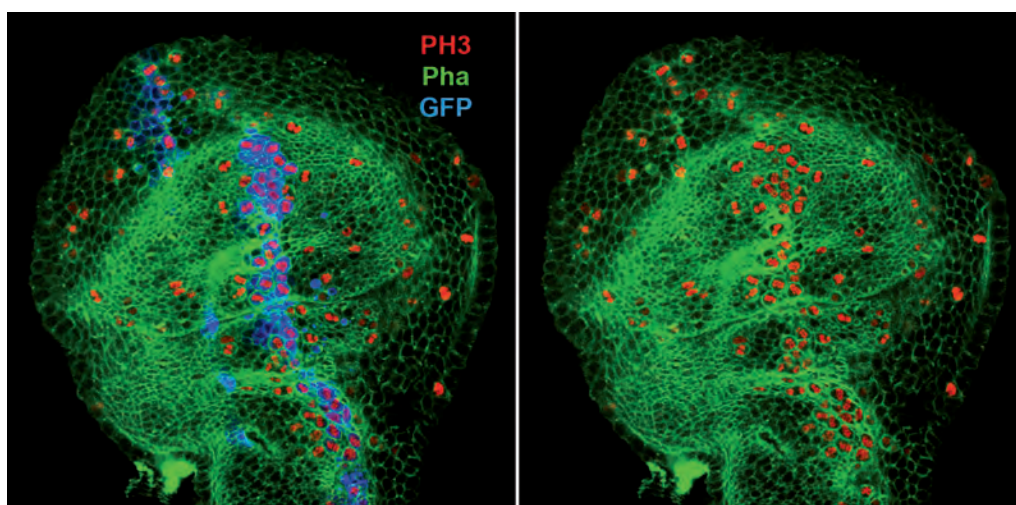


Figura 1. Patrón de división celular de un disco imaginal de ala en el que hemos expresado de forma ectópica en el dominio *patch* Gal-4 una serina-Treoninaquinasa que induce proliferación. En Rojo el marcador mitótico PH3, en verde el marcador de actina, faloidina y en azul la expresión de GFP marca las células del dominio de expresión de *patch*.

Figure 1. Pattern of cell proliferation of an imaginal wing discs over-expressing under the regulation of *patch*-Gal4 a serine/threonine Kinase that induces an excess of cell proliferation. In red the mitotic marker Phospho-Histone3, in green the actine marker phalloidin and in blue are shown the cells that express GFP in the domain of expression of *patch*.

Morfogénesis y Diferenciación del Sistema Nervioso de Vertebrados

Morphogenesis and Differentiation of the vertebrate CNS

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Paola Bovolenta Nicolao

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Pilar Esteve Pastor
Floresia Cavodeassi Madarro

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Raquel Marco Ferreres
Luisa Sánchez Arrones
Elsa Cisneros Niño

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Leonardo Beccari
Marcos Cardozo Ruiz

Inmaculada Crespo Galán
Lara Durán Trío
Francisco Javier Nieto López
Javier Rueda Carrasco
Sergio Salguero Fernández

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
África Sandoz Consuegra
Noemí Tabanera Anguita

Resumen de investigación

Nuestra investigación pretende definir los mecanismos que controlan el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados, centrándose en el sistema visual y en aquellos aspectos que puedan ayudar a determinar las causas de malformaciones congénitas del ojo o que están relacionadas con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. En estos dos años nuestros esfuerzos se han dirigido principalmente a definir las redes transcripcionales responsables de la regionalización del prosencéfalo. Varios factores de transcripción fundamentales para la especificación del ojo se expresan en todo el prosencéfalo, indicando que deben existir mecanismos que permitan diversificar sus funciones en cada región del prosencéfalo. Utilizando un enfoque multidisciplinario en pez medaka y enfocándonos en Six3, un factor que se expresa en todo el prosencéfalo anterior, hemos demostrado que estos mecanismos incluyen unos niveles de expresión distintos entre los dominios prosencefálicos y la integración de Six3 en diferentes redes transcripcionales. Por otro lado, en colaboración con otros grupos del CBMSO, hemos analizado el papel de las “Secreted Frizzled Related Proteins” durante el desarrollo del ojo en ratón. Estas proteínas actúan como inhibidores de la vía de señalización de Wnt. Sin embargo, hemos demostrado que la actividad conjunta de dos miembros de la familia, Sfrp1 y Sfrp2, es responsable de la especificación de la parte periférica del ojo y del control de la neurogénesis de la retina central utilizando dos mecanismos distintos. En la retina periférica, Sfrp1/Sfrp2 facilitan la difusión de los ligandos Wnt, actuando así como moduladores positivos de la vía canónica de Wnt. En la retina central, en cambio, modulan negativamente ADAM10, una metaloproteasa implicada en la activación de la vía de señalización de Notch, fundamental en la neurogénesis de la retina. Además, en un proyecto de colaboración con otros miembros del CIBERER hemos analizado los mecanismos responsables de una patología neurodegenerativa, la enfermedad de Lafora.

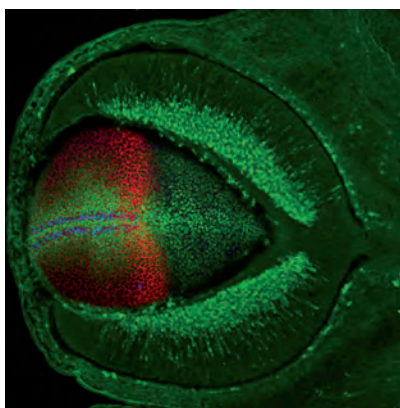


Figura 1. Imagen compuesta de una sección de ojo de un embrión de ratón en el cual la lente ha sido substituida por la imagen de un disco imaginal de una ala de *Drosophila*.

Figure 1. Montage of a cryostat section from an E13.5 mouse eye, in which the lens has been substituted with the image of a *Drosophila* wing imaginal disc.

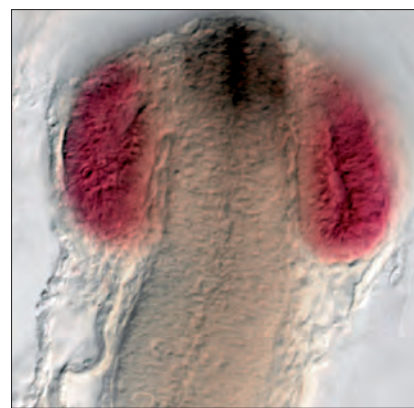


Figura 2. Embrión de pez medaka de estadio 21 hibridado *in toto* con marcadores específicos de retina (rojo) y de telencefalo (marrón).

Figure 2. Double staining of St21 medaka fish embryo hybridised *in toto* with retinal (red) and telencephalic (brown) specific markers.

Research summary

Our research aims at defining the molecular mechanisms that control the early development of the vertebrate nervous system, mostly focusing on the visual system. We are particularly interested in those aspects that may help pinpointing the causes of congenital eye malformations or in those related to the onset of neurodegenerative diseases. During these two years we have dedicated our effort to establish the transcriptional scaffold required for forebrain specification. Many regulators of eye development are expressed throughout the forebrain, raising the question of how is their activity diversified to lead to different patterning outcomes. Using multidisciplinary approaches in medaka fish, we have shown that graded expression levels and integration in different transcriptional networks are key mechanisms by which a transcription factor important in forebrain specification, *Six3*, differentially contributes to forebrain patterning. On the other hand in collaboration with other researchers of the CBMSO, we have analysed the role of Secreted Frizzled Related Proteins during mouse eye development. Sfrps are well-accepted Wnt signalling inhibitors. However, our work has demonstrated that the combined activity of two members of the family, *Sfrp1* and *Sfrp2*, is involved in both the specification of the retinal periphery and the neurogenesis of the central retina with two different mechanisms of action. In the retinal periphery, *Sfrp1* and *Sfrp2* favour the diffusion of Wnt ligands acting as positive modulators of Wnt canonical signalling. In the central retina, instead, they negatively modulate ADAM10, a metalloprotease that activates the Notch pathway, which, in turn, controls retinal neurogenesis. As part of a collaborative effort with other members of the CIBERER, we have also analysed the molecular mechanisms responsible for the neurodegenerative events that characterize the Lafora Disease.

Publicaciones / Publications

Sánchez-Camacho, C. Cano JA, Ocaña, I, Alcantara S, and Bovolenta P. (2011) Appropriate Bmp7 levels are required for the timely differentiation of the guidepost cells that support corpus callosum formation. *Dev Neurobiol.* **71**, 337–350

Esteve P., Sandonis A., Cardozo M., Malapeira J., Ibañez C., Crespo I., Marcos S., Gonzalez-Garcia S., Toribio M.L., Arribas J., Shimono A., Guerrero I. and Bovolenta P. (2011). Sfrps act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **14**, 562-569.

Esteve, P., Sandonis A., Ibañez C., Shimono A., Guerrero I. and Bovolenta P. (2011) Secreted Frizzled-Related Proteins are required for Wnt/βcatenin signalling activation in the vertebrate optic cup. *Development* **138**, 4179-4184.

Beccari L., Conte I*, Cisneros E.* and Bovolenta P. (2012) Sox2-mediated differential activation of *Six3.2* contributes to forebrain patterning. *Development* **139**, 151-164.

Bovolenta P. and Sánchez-Arrones L. (2012) Shh goes multidirectional in axon guidance. *Cell Res.* **22**, 611-613

Criado O*, Aguado C*, Gayarre J*, Duran-Trio L*, Garcia-Cabrero A.M.* Vernia S*, San Millán B., Heredia M., Romá-Mateo C., Mouron S., Domínguez M., Navarro C., Serratosa JM, Sanchez M, Sanz P., Bovolenta P., Knecht E and Rodríguez de Córdoba S. (2012) Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy. *Hum. Mol. Gen.* **21**, 1521-1533.

Sánchez-Arrones, L., Stern, C.D., Bovolenta, P. and Puelles, L. (2012) Sharpening of the anterior neural border in the chick by rostral endoderm signalling. *Development* **139**, 1034-1044

Sebastián-Serrano A, Sandonis A, Cardozo M, Rodríguez-Tornos, F.M., Bovolenta P. and Nieto M. (2012) Pax6 expression in postmitotic neurons mediates the growth of axons in response to SFRP1. *PLoS One*, **7**(2): e31590.

Sánchez-Arrones, L.*, Cardoso, M.*, Nieto-Lopez, F. and Bovolenta P. (2012) Boc and Cdo: two trans-membrane proteins implicated in cell-cell communication. Series of Molecules on Focus; *IJBCB* **44**; 698– 702.

Knecht, E., Criado O, Aguado C, Gayarre J, Duran-Trio L, Garcia-Cabrero A.M. Vernia S, San Millán B., Heredia M., Romá-Mateo C., Mouron S., Domínguez M., Navarro C., Serratosa JM, Sanchez M, Sanz P., Bovolenta P., and Rodríguez de Córdoba S. (2012) Malin knockout mice support a primary role of autophagy in the pathogenesis of Lafora Disease. *Autophagy* **8**, 1–3

Yusuf D, Butland SL, Swanson MI, Bolotin E, Ticoll A, Cheung WA, Zhang XY, Dickman CT, Fulton DL, Lim JS, Schnabl JM, Ramos OH, Vasseur-Cognet M, de Leeuw CN, Simpson EM, Ryffel GU, Lam EW, Kist R, Wilson MS, Marco-Ferreres R, Brosens J, Beccari L, Bovolenta P, Benayoun BA, et al, and Wasserman WW (2012) The Transcription Factor Encyclopedia. *Genome Biol.* **13**, R24.

Otras actividades / Other activities

Miembro Electo de la European Molecular Biology Organization (EMBO).

Premio a la investigación Fundaluce 2012.

Patentes / Patents

Autores. Paola Bovolenta, Pilar Esteve, África Sandonis, Inmaculada Crespo, Isabel Guerrero, Carmen Ibañez, Jordi Malapeira, Joaquín Arribas y Akiko Shimono. Título. "Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que emplea *Sfrp1* como biomarcador". Número de prioridad: PCT/ES2012/070226. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 3 Abril, 2013. Propietario: CSIC. Licenciario (en su caso).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Leonardo Beccari (2011) Estudio del control transcripcional de los genes *Six* en vertebrados. UAM. Paola Bovolenta Nicolao.

Regulación epigenética de la expresión génica durante el desarrollo de *Drosophila*

Epigenetic regulation of gene expression during Drosophila development



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Ana María de Busturia Jimeno

Contratado Postdoctoral /
Postdoctoral Fellow:
Ricardo Aparicio

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Rocío Simón
Olga Redondo
Sol Fereres

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Carolina Simoes da Silva
Pereira
Chidiebere U. Awah
Carlos Molina
Julia Díaz

Resumen de investigación

La investigación que se realiza en mi laboratorio esta enfocada en el estudio de la regulación epigenética de la expresión génica mediada por microRNAs y por las proteínas de los grupos Polycomb (PcG) y trithorax (trxG). Usamos *Drosophila* como sistema modelo para entender el desarrollo normal y patológico de los organismos.

Un estado transcripcional génico se establece bien activo o reprimido dependiendo del contexto celular, del proceso biológico o del tiempo del desarrollo. Una vez establecidos, se deben de mantener durante la proliferación celular para alcanzar un desarrollo normal. Las proteínas PcG/trxG controlan la memoria transcripcional y lo hacen mediante la compactación de la cromatina y la modificación de las histonas. Por otro lado, los microRNAs son también reguladores post-transcripcionales que mediante su unión a los RNAs mensajeros diana, promueven generalmente el silenciamiento génico. Queremos entender como el equilibrio entre activación y represión afecta la homeostasis de un organismo mediante el estudio de la función de los microRNAs y la relevancia de los niveles de expresión y/o de la actividad de las proteínas PcG/trxG en el desarrollo normal y patológico. Esto lo llevamos a cabo a través del estudio de la función de estos reguladores epigenéticos en el control de la proliferación celular, la apoptosis y la respuesta innata inmune.

Los microRNAs y las proteínas PcG/trxG están conservadas en la evolución, por lo que se espera que los resultados obtenidos de nuestras investigaciones tengan un impacto directo en el entendimiento de la funciones de estos reguladores epigenéticos en otros organismos, incluido los humanos. Además nuestro estudios nos pueden llevar a un mas profundo entendimiento de los mecanismos que controlan la génesis y la progresión de las enfermedades humanas.

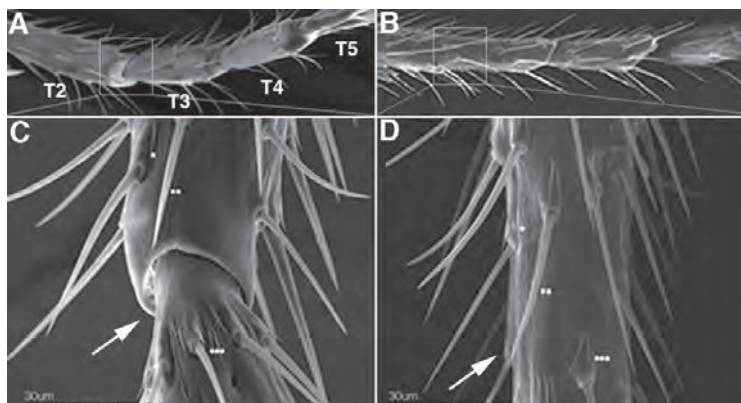


Figura 1. Altos niveles de la proteína SKPA inhiben la formación de las articulaciones de las patas de *Drosophila* (A) Pata protorácica de una mosca wild type mostrando los segmentos tarsales T2-T5. Indicado en el recuadro esta la articulación entre lo segmentos T2 y T3. (B) Pata protorácica mostrando los segmentos tarsales T2-T5 en la que se ha sobre-expresado la proteína SKPA. Indicado en el recuadro esta la presumtiva articulación entre lo segmentos T2 y T3. (C) Articulación wild type (flecha) entre los segmentos T2 y T3. (D) La articulación (flecha) entre los segmentos T2 y T3 no se forma debido a los altos niveles de *skpA*. Los puntos blancos indican la posición de las quetas como referencia para localizar las articulaciones. Las barras de calibración representan 30µm.

Figure 1. High levels of SKPA protein inhibit joint development. (A) Wild type prothoracic leg showing tarsal segments T2-T5. Indicated (square) is the joint between T2 and T3. (B) Prothoracic leg showing tarsal segments T2-T5 where the protein SKPA has been overexpressed. Indicated (square) is the presumptive joint between T2 and T3. (C) Enlargement of the T2-T3 wild type joint (arrow). (D) Enlargement of the T2-T3 presumptive joint (arrow) not properly formed. White dots indicate position of corresponding bristles as reference points to locate the joints. Scale bars represent 30µm.

Research summary

Research in my laboratory is focused on the study of the epigenetic regulation of gene expression mediated by the Polycomb (PcG) and trithorax (trxG) groups of proteins as well as by microRNAs. We use *Drosophila* as a model system to understand normal and pathological development.

Gene transcriptional states are established as either active or repressed depending on the cellular context, biological process or developmental time. Once established, they have to be faithfully maintained throughout proliferation in order to achieve normal development. PcG and trxG proteins control the transcriptional memory and they do so by compacting chromatin and by modification of histones. Moreover, microRNAs are also post-transcriptional regulators that bind to their mRNAs targets usually resulting in gene silencing. We aim to understand how activation and repression affects the homeostasis of an organism by studying the function of the microRNAs and the relevance of the expression levels and/or activity of the PcG/trxG proteins in normal and pathological development. This research is done through the study of the function of these epigenetic regulators in the control of cell proliferation, apoptosis and innate immune response. Moreover, to gain insight into the mechanisms that provide the PcG/trxG with the characteristics of a dynamic, reversible and adaptable control system, we also study to what external cues and signals the microRNAs and the PcG/trxG system responds.

As the microRNAs and the PcG/trxG proteins are highly conserved throughout the animal kingdom, it is expected that our research should yield results that directly impact on the understanding of the function of these proteins in other organisms, including humans. Moreover, deciphering the role(s) of miRNAs and PcG/trxG may lead to a more profound understanding of the mechanisms controlling the genesis and progression of human diseases.

Publicaciones / Publications

Rodríguez-Jato, S., Busturia, A., and Herr, W. (2011) *Drosophila* melanogaster dHCF interacts with both PcG and TrxG epigenetic regulators. *PLoS One* 6(12).

Popkova, A., Bernardoni, R., Diebold, C., Van de Bor, V., Schuetten-gruber, B., González, I., Busturia, A., Cavalli, G., and Giangrande, A. (2012). Polycomb controls gliogenesis by regulating the transient expression of the gcm/glide fate determinant. *PLoS Genet.*; 8(12):e1003159.

Olga Redondo y Ana Busturia (2011). Función del microRNA 306 durante el desarrollo de *Drosophila*. Publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid como reconocimiento a los mejores trabajos de Master presentados en la UAM.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Ricardo Aparicio Crespo (2012). Función del gen dRYBP durante el desarrollo de *Drosophila*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Ana Busturia.

TRABAJOS DE MÁSTER / MASTER THESES

Olga Redondo Hernández (2011). Función del microRNA 306 en la regulación de la expresión del gen dRYBP de *Drosophila*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Ana Busturia.

Sol Fereres Rapoport (2011). SKPA, a dRYBP interacting protein, functions to prevent apoptosis in *Drosophila*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Ana Busturia.

Base molecular y celular de la organogénesis en *Drosophila**Molecular and cellular basis of Drosophila organogenesis*

Jefe de Línea / Group Leader:
Sonsoles Campuzano Corrales

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:

Rosario Hernández Baeza

Doctor vinculado
Juan Modolell Mainou

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Natalia Barrios López
Esther González Pérez
Anabel Rodríguez Learte

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Alvaro Román Fernández

Resumen de investigación

Los genes del complejo Iroquois (*iro*) de *Drosophila*, *araucan*, *caupolican* y *mirror* codifican factores de transcripción altamente relacionados que desempeñan numerosas funciones durante la organogénesis. Mediante la generación de nuevos mutantes *iro* hemos determinado que sus funciones no son totalmente redundantes. Así, *araucan* y *caupolican*, pero no *mirror*, definen el destino de músculo latero-transverso en el embrión mientras que sólo *mirror* interviene en la especificación del eje dorso-ventral embrionario. Por el contrario, los tres genes *iro* actúan como supresores de tumores modulando la progresión del ciclo celular a nivel del paso G1- S. Asimismo, hemos demostrado que el ligamiento, evolutivamente conservado, de los genes *iro* (*lrx* en vertebrados) con el gen *sowah* (funcionalmente no relacionado) se debe a la presencia en los intrones de *sowah* de enhancers que controlan la expresión de *araucan* y *caupolican*. La actuación de éstos y otros enhancers sobre *mirror* estaría impedida por secuencias aisladoras que estamos analizando (Figura 1). Por otro lado, hemos iniciado la caracterización de la red de regulación génica de la que forman parte los genes *iro* identificando dos de sus genes diana.

La polarización apico-basal de las células epiteliales se requiere para el desarrollo y funcionamiento de numerosos órganos. Recientemente hemos demostrado cómo el determinante apical Crumbs contribuye a la formación de las tráqueas. Por otro lado, pérdida de polaridad e hiperproliferación son rasgos típicos de células tumorales. Las células epiteliales mutantes para *crumbs* o para la proteína quinasa C atípica (*DaPKC*) muestran esas dos características. Por ello, para determinar la relación causal entre falta de polaridad e hiperproliferación, estamos estudiando qué vías de señalización se encuentran desreguladas en dichos mutantes. Hemos observado que las vías de Hippo y Notch se encuentran afectadas (Figura 2), en este último caso asociado a un defectuoso tráfico intracelular del receptor Notch.

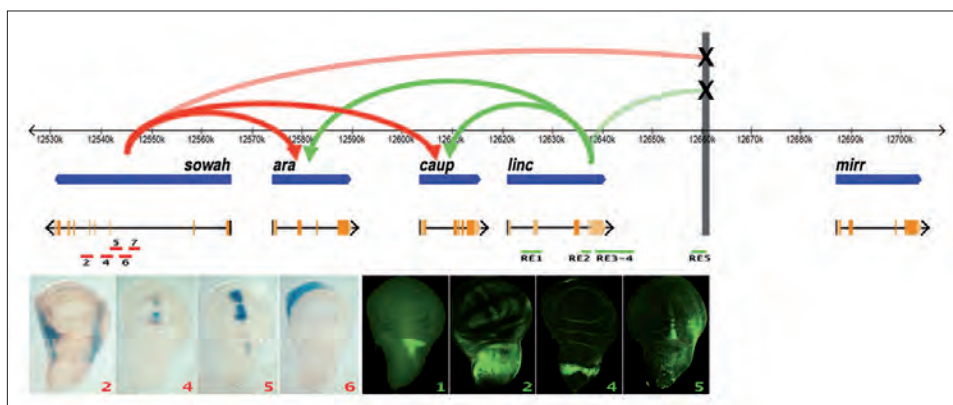


Figura 1. Modelo de la regulación en *cis* del Complejo Iroquois. El DNA genómico del Complejo Iroquois alberga secuencias enhancer (barras rojas y verdes) que dirigen la expresión de genes marcadores en diversas regiones del disco imaginal de ala. Dichos enhancers controlarían la expresión de los genes *araucan* y *caupolican* mientras que elementos aisladores (línea vertical gris) impedirían su actuación sobre el promotor de *mirror*.

Figure 1. Model for the *cis*-regulation of the Iroquois Complex. The genomic DNA of the Iroquois Complex harbours enhancer sequences (red and green bars) that drive expression of reporter genes in several domains of the wing imaginal disc. These enhancers should control expression of *araucan* and *caupolican* while insulator elements (grey bar) would prevent their action on the *mirror* promoter.

Research summary

The *Iroquois* (*iro*) complex genes *araucan*, *caupolican* and *mirror*, encode highly related transcription factors that play a plethora of functions during organogenesis. By means of the generation of novel *iro* mutants, we have determined that their functions are not totally redundant. Thus, *araucan* and *caupolican*, but not *mirror*, define the lateral transverse muscle fate in the embryo while only *mirror* is involved in the specification of the dorso-ventral embryonic axis. Conversely, the three *iro* genes act as tumour suppressor modulating cell cycle progression at the level of the G1 to S transition. In addition, we have shown that the linkage, evolutionarily conserved, of *iro* genes (*Ir*x in vertebrates) with the functionally unrelated *sowah* gene is due to the presence at *sowah* introns of enhancers that drive expression of *araucan* and *caupolican*. Action of these and other *iro* enhancers over *mirror* should be precluded by insulator sequences that we are in the process of studying (Figure 1). On the other hand, we have initiated the characterization of the *iro* gene regulatory network having identified two of their target genes.

Apico-basal polarity of the epithelial cells is required for development and function of numerous organs. We have recently shown how the apical determinant *Crumbs* contributes to trachea formation. On the other hand, loss of polarity and hyper proliferation are two hallmarks of tumour cells. Epithelial cells mutant for *crumbs* or the atypical protein kinase C (*DaPKC*) display these two traits. Thus, to investigate the causal relationship between loss of cell polarity and uncontrolled proliferation, we are studying which signalling pathways are deregulated in those mutant conditions. We have observed malfunction of the Hippo and Notch signalling pathways (Figure 2), in the latter case in association with a defective intracellular trafficking of the Notch receptor.

Publicaciones / Publications

Letizia, A., Sotillos, S., Campuzano, S. and Llimargas, M. (2011) Crb regulated accumulation controls apical constriction and invagination in *Drosophila* tracheal cells. *J. Cell Sci.* **124**, 240- 251.

Carrasco-Rando, M., Tutor, A.S., Prieto-Sánchez, S., González-Pérez, E., Barrios, N., Letizia, A., Martín, P., S. Campuzano and Ruiz-Gomez, M. (2011) *Drosophila* Araucan and Caupolican integrate in muscle precursors intrinsic and signalling inputs for the acquisition of the lateral transverse fate. *PLOS Genet* **7**(7):e1002186.

Andreu, M. J., Gonzalez-Perez, E., Ajuria, L., Samper, N., Gonzalez-Crespo, S., Campuzano, S. and Jimenez, G. (2012) Mirror represses pipe expression in follicle cells to initiate DV axis formation in *Drosophila*. *Development* **139**, 1110 -1114.

Andreu, M. J., Ajuria, L., Samper, N., González-Pérez, E., Campuzano, S., González-Crespo, S. and Jiménez, G. (2012) EGFR-dependent downregulation of Capicua and the establishment of *Drosophila* dorsoventral polarity. *Fly* **6**, 234-239.

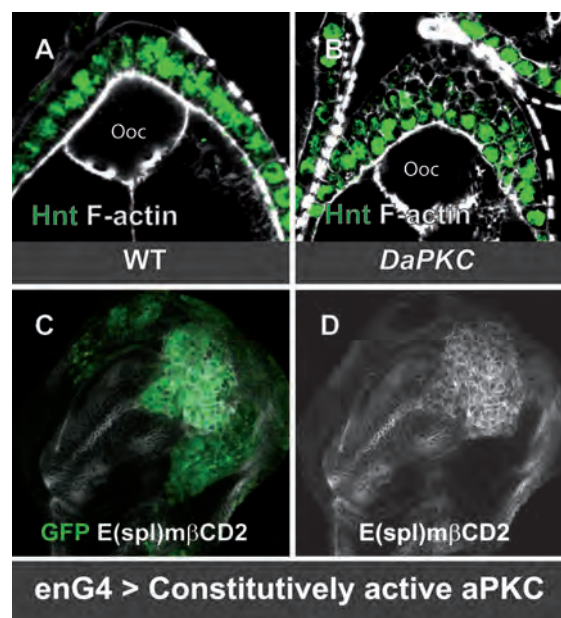
Maeso, I., Irimia, M., Tena, J. J., González-Pérez*, E., Trans, D., Ravi, V., Venkatesh, B., Campuzano, S., Gómez-Skarmeta J. L. and Garcia-Fernandez, J. (2012) An ancient genomic regulatory block conserved across bilaterians and its dismantling in tetrapods by retrogene replacement. *Genome Res.* **22**, 642-655.

Tesis doctorales / Doctoral theses

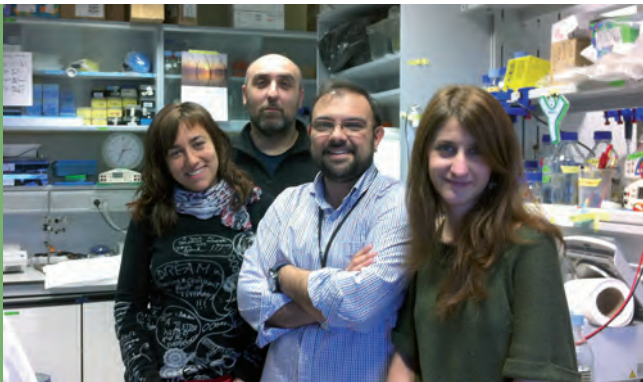
Natalia Barrios López. (2012) Las proteínas del Complejo Iroquois de *Drosophila melanogaster* controlan el progreso del ciclo celular y se regulan por fosforilación dependiente de MAPK. Universidad Autónoma de Madrid. Directora: Sonsoles Campuzano.

Figura 2. Modulación de la actividad de la vía de Notch por DaPKC. La falta de función de *DaPKC* en el epitelio folicular impide el correcto funcionamiento de la vía de Notch (A, B). En el disco de ala, se observa un incremento en la actividad de la vía de Notch asociado a la activación constitutiva de *DaPKC* (C, D), el territorio donde se expresa *DaPKC* constitutivamente activa está marcado con GFP). La actividad de la vía de Notch se determinó por la expresión de sus genes diana *hnt* y *E(spl)mβ*. Ooc, oocito; wt, epitelio folicular de tipo silvestre. *DaPKC*, epitelio folicular mutante para *DaPKC*.

Figure 2. Modulation of the activity of the Notch signalling pathway by *DaPKC*. *DaPKC* loss of function in the follicular epithelium prevents adequate Notch pathway activity (A, B). In the wing disc, enhanced activity of the Notch pathway was found associated with constitutive activation of *DaPKC* (C, D), the domain where constitutively active *DaPKC* is expressed is GFP labelled). Activity of the Notch pathway was monitored by expression of its target genes *hnt* and *E(spl)mβ*. Ooc, oocyte; wt, wild type follicular epithelium. *DaPKC*, follicular epithelium devoid of *DaPKC*.



Plasticidad Celular en Desarrollo y Cáncer

Cellular Plasticity in Development and Cancer

Jefe de Línea / *Group Leader:*
César Cobaleda Hernández

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Juan de Dios Hourcade Bueno

Predoctorales / *Graduate Students:*
Elena Campos Sánchez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Amparo Toboso Navasa

Resumen de investigación

En nuestro grupo estudiamos la plasticidad celular dentro del sistema hematopoyético y su modulación en condiciones fisiológicas (desarrollo normal) y patológicas (cáncer y síndromes del desarrollo), usando modelos de ratón modificados genéticamente en los que regulamos los niveles y las ventanas celulares de expresión de genes modificadores epigenéticos y factores de transcripción, normales u oncogénicos.

En humanos, en general, el oncogén responsable del origen tumoral está presente en todas las células del tumor. La hipótesis de las células madre tumorales (el hecho de que el cáncer pueda ser un tejido jerarquizado mantenido por células madre malignas) sugiere la posibilidad de que la información genética responsable del tumor sólo necesite estar realmente en dichas células madre tumorales. Hemos generado modelos animales de tumores hematopoyéticos como el mieloma múltiple o los linfomas, cuya caracterización nos ha permitido demostrar que se puede inducir el desarrollo tumoral en ratones restringiendo la expresión oncogénica (p.ej, del oncogén *MafB*) exclusivamente a las células madre iniciadoras del tumor. El mieloma múltiple es una neoplasia caracterizada por la proliferación clonal de células plasmáticas malignas, y tan sólo una minoría de los pacientes es curada con las terapias actuales. Tradicionalmente se ha asumido que el mieloma se originaba en células diferenciadas. Nuestros datos constituyen la primera evidencia de la generación de mieloma como consecuencia de un mecanismo similar al de la reprogramación celular, y desafían el modelo de función de los oncogenes en el cáncer que se aceptaba hasta ahora, pues suponen la primera demostración práctica de que el mieloma se organiza jerárquicamente como un tejido. Esto explica las recaídas de los pacientes, e indica que las dianas para destruir las células que mantienen el cáncer no pueden ser identificadas estudiando las células tumorales diferenciadas (aunque sean éstas las que compongan la mayor parte del tumor).

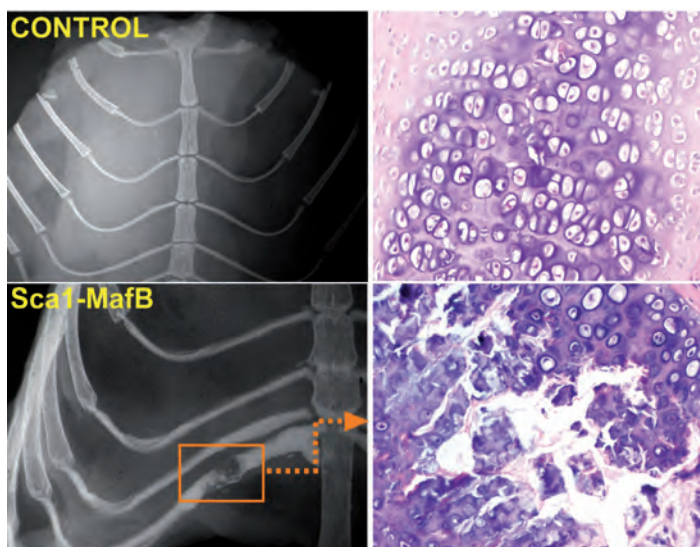


Figura 1. Lesiones osteolíticas, típicas del mieloma múltiple humano, en ratones transgénicos Sca1-MafB (de Vicente-Dueñas et al., 2012).

Figure 1. Lytic bone lesions, characteristic of human multiple myeloma, in Sca1-MafB transgenic mice (from Vicente-Dueñas et al., 2012).

Research summary

Research in our group is focused on the study of cellular plasticity in the hematopoietic system and how it is controlled both in pathological conditions (cancer and developmental syndromes) and in normal development. As experimental tool we use genetically engineered mouse models in which we modify the levels and windows of expression of transcription factors and epigenetic regulators, either normal or oncogenic.

In humans, in general, the oncogene responsible for the tumoral origin is present also in all the tumoral cells. The cancer stem cell model (postulating that cancer is a hierarchically organized tissue maintained by malignant cancer stem cells), however, suggests the possibility that the genetic information responsible for tumor generation might only be needed at the level of these cancer stem cells. We have generated mouse models of hematopoietic neoplasms like multiple myeloma or lymphomas, and their characterization has allowed us to prove that it is indeed possible to induce tumor development in the mouse by restricting oncogene expression (e.g. the *MafB* oncogene) to the stem/progenitor cells responsible for tumor origin and maintenance. Multiple myeloma is an incurable neoplasm characterized by the accumulation of malignant clonal plasma cells, and only a minority of patients can be cured with current therapies. Traditionally, it has been assumed that myeloma was originated from differentiated cells. Our data provide the first evidence showing the generation of myeloma by a mechanism similar to reprogramming to pluripotency, and they challenge the currently accepted mode of action of oncogenes in cancer, since they are the first practical demonstration showing that myeloma is hierarchically organized as a tissue. This explains patients' relapses and indicates that the targets to destroy the cancer-maintaining cells cannot be identified by studying differentiated tumor cells (even if these are the most abundant cells in the tumor).

Publicaciones / Publications

Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., González-Herrero, I., Alonso-Escudero, E., Abollo-Jiménez, F., Jiang, X., Gutiérrez, N.C., Orfao, A., Marín, N., Villar, L.M., Criado, M.C., Pintado, B., Flores, T., Alonso-López, D., De Las Rivas, J., Jiménez, R., Criado, F.J., Cenador, M.B., Lossos, I.S., Cobaleda, C. and Sánchez-García, I. (2012) A novel molecular mechanism involved in multiple myeloma development revealed by targeting *MafB* to haematopoietic progenitors. *EMBO J.* **31**, 3704-3717.

Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., García-Criado, F., Cobaleda, C. and Sánchez-García, I. (2012) The cellular architecture of multiple myeloma. *Cell Cycle* **11**, 2961-2962.

Vicente-Dueñas, C., Fontán, L., González-Herrero, I., et al. (2012) Expression of MALT1 Oncogene in Hematopoietic Stem / Progenitor Cells Recapitulates the Pathogenesis of Human Lymphoma in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 10534-10539.

Vicente-Dueñas, C., Cobaleda, C., Martínez-Climent, J.A. and Sánchez-García, I. (2012) MALT lymphoma meets stem cells. *Cell Cycle* **15**, 2961-2962.

Campos-Sánchez, E., Sánchez-García, I. and Cobaleda, C. (2011) Plasticity and Tumorigenicity. *Atlas of Genetics & Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2012; 16(3), DOI: 10.4267/2042/47289.

Cobaleda, C., Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I. and Sánchez-García, I. (2012) Cancer Stem Cells. *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Cobaleda, C. and Sánchez-García, I. (2011) Stem cell aging and cancer: Immortal but vulnerable. *Cell Cycle* **10**(17), 2823-2824.

Campos-Sánchez, E., Toboso-Navasa, A., Romero-Camarero, I., Barajas-Diego, M., Sanchez-Garcia, I. and Cobaleda, C. (2011) Acute Lymphoblastic Leukemia and Developmental Biology: A Crucial Interrelationship. *Cell Cycle* **10**(20), 3473-3486.

Ziegelberger, G., Baum, C., Borkhardt, A., Cobaleda, C., Dasenbrock, C., Dehos, A., Grosche, B., Hauer, J., Hornhardt, S., Jung, T., Kammertoens, T., Lagroye, I., Lehrach, H., Lightfoot, T., Little, M.P., Rossig, C., Sanchez-Garcia, I., Schrappe, M., Schuez, J., Shalapour, S., Slany, R., Stanulla, M. and Weiss, W. (2011) Meeting report on research recommendations towards a better understanding of the causes of Childhood Leukemia. *Blood Cancer Journal* **1**, e1.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Fernando Abollo Jiménez (2011). Identificación y caracterización funcional de nuevos factores de transcripción implicados en la progresión leucémica y la hematopoyesis. Universidad de Salamanca. Directores: César Cobaleda Hernández e Isidro Sánchez García.

Otras actividades / Other activities

Miembro "ad hoc" de los comités de la Oficina Federal Alemana para la Protección contra la Radiación (BfS) y el Instituto Francés para la Protección contra la Radiación y Seguridad Nuclear (IRSN) encargados de definir los futuros programas de investigación sobre el posible papel de los factores ambientales en la patogénesis de las leucemias infantiles.

"Ad hoc" member of the committees of the German Federal Office for Radiation Protection (BfS) and the French Institute for Radiation Protection and Nuclear Safety (IRSN), in charge of defining future research programs on the role of environmental factors in the pathogenesis of childhood leukemia.

Patentes / Patents

Cobaleda Hernández, C., Sánchez García, I., Martínez Climent, J.A., Fontán Gabás, L., Vicente Dueñas, C. "A non-human animal model of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma." EP 11382319, 11/10/2011. CSIC e Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A. (ICTDP).

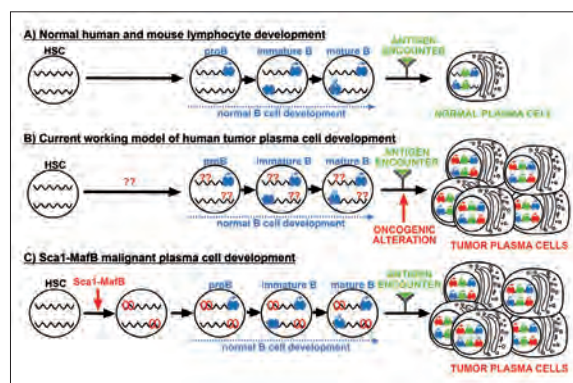


Figura 2. La expresión ectópica de *MafB* reprograma las células madre hacia células tumorales. (A) Desarrollo linfóide normal. (B) Actualmente se acepta que el efecto oncogénico de *MafB* ocurre en células diferenciadas. La naturaleza de la célula de origen del mieloma es desconocida. (C) La expresión *stem* de *MafB* causa cambios epigenéticos latentes que desempeñarán su función en la diferenciación terminal, llevando a la aparición de las células plasmáticas tumorales.

Figure 2. Ectopic expression of *MafB* reprogrammes stem cells into tumor plasma cells. (A) Normal lymphoid development. (B) Currently, *MafB* oncogenic effects are thought to occur in differentiated cells. The nature of the myeloma cell-of-origin is unknown. (C) Stem expression of *MafB* causes latent epigenetic changes that will become active at the terminal differentiation, leading to the appearance of tumor plasma cells.

Análisis de la señalización celular durante el desarrollo de epitelios en *Drosophila melanogaster*

Signalling pathways directing wing development and vein pattern formation in *Drosophila*



Jefe de Línea / Group Leader:
José F. de Celis Ibeas

Personal Científico /
Scientific Staff:
Ana Ruiz Gómez
Ana López Varea
Carlos Estella Sagrado
Cristina Grande

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Cristina Molnar-d'Arkos Muro

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Martín Resnik Docampo
María Fernández Organista
Mercedes Martín Fernández
Covadonga Fernández Hevia
Marta Truchado García

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Nuria Esteban Delgado
Verónica Flores

Resumen de investigación

El ala de *Drosophila* se origina a partir de un epitelio (disco imaginal de ala) cuyo crecimiento y diferenciación depende de la actividad de rutas de señalización y factores de transcripción conservados en diferentes organismos. El objetivo de nuestra línea es caracterizar la contribución de diferentes rutas de señalización celular al desarrollo del disco imaginal de ala. Mediante mutagénesis de falta y ganancia de función hemos identificado y caracterizado las funciones de los genes *gmd*, *MAP4K3*, *kurtz*, *kismet* y *spalt*. Los análisis funcionales que realizamos consisten en estudiar los efectos de la falta de función de estos genes, sus patrones de expresión mediante hibridación in situ, y la localización sub-celular de las proteínas correspondientes. Nuestros estudios han permitido definir su participación en las rutas de señalización de Notch (*gmd*), Insulina (*MAP4K3*), Hedgehog (*kurtz* y *kismet*) y TGF β (*spalt*).

El análisis llevado a cabo en *Drosophila* permitirá el estudio de estos genes en otros organismos donde sus funciones podrían estar relacionadas con el desarrollo normal y la aparición de enfermedades de origen genético. Nuestra línea incluye también a dos contratados del programa Ramón y Cajal, Dr. Carlos Estella y Dra. Cristina Grande, que disfrutaban de proyectos independientes y cuyas líneas de investigación consisten en el estudio de la formación del patrón de los apéndices de *Drosophila* (Dr. Carlos Estella), y el estudio de la evolución de los planes corporales en organismos bilaterales (Dra. Cristina Grande).

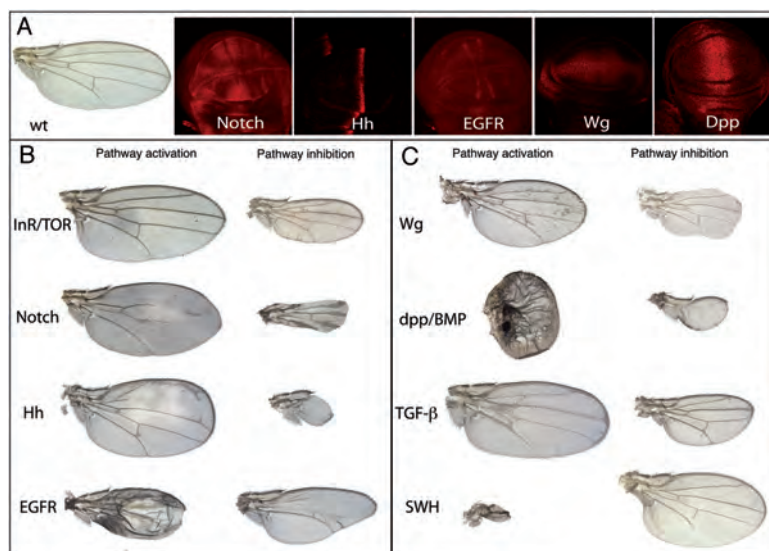


Figura 1. (A) Ala silvestre de *Drosophila melanogaster* (izquierda) y dominios de activación en el disco imaginal de ala (en rojo) de las rutas de señalización Notch (Notch), Hedgehog (Hh), Epidermal growth factor receptor (EGFR), Wingless/Wnt (Wg) y Decapentaplegic/BMP (Dpp). (B) Fenotipo de alas en las que se ha manipulado la actividad de las rutas de señalización Insulina (InR/Tor), Notch (Notch), Hedgehog (Hh) y Epidermal growth factor receptor (EGFR), bien por activación (columna "Pathway activation") o por inhibición (columna "Pathway inhibition"). (C) Fenotipo de alas en las que se ha manipulado la actividad de las rutas de señalización Wingless (Wg), decapentaplegic/BMP (dpp/BMP), Transforming growth factor b (TGF β) y Salvador/Warts/Hippo (SWH), bien por activación (columna "Pathway activation") o por inhibición (columna "Pathway inhibition").

Figure 1. (A) *Drosophila melanogaster* wild type wing (left) and domains of activation in the wing disc (red) of the Notch (Notch), Hedgehog (Hh), Epidermal growth factor receptor (EGFR), Wingless/Wnt (Wg) and Decapentaplegic/BMP (Dpp) signalling pathways. (B) Wing phenotypes resulting from manipulations in the activity of the Insulin (InR/Tor), Notch (Notch), Hedgehog (Hh) and Epidermal growth factor receptor (EGFR) signalling pathways, either by activation (column "Pathway activation") or by inhibition (column "Pathway inhibition"). (C) Wing phenotypes resulting from manipulations in the activity of the Wingless (Wg), decapentaplegic/BMP (dpp/BMP), Transforming growth factor b (TGF β) and Salvador/Warts/Hippo (SWH) signalling pathways, either by activation (column "Pathway activation") or by inhibition (column "Pathway inhibition").

Research summary

*The Drosophila wing originates from an epithelial tissue (wing imaginal disc), which growth and differentiation depends on the activity of conserved signalling pathways and transcription factors. The main focus of our work is to characterise the contribution of signalling pathways to the regulation of imaginal wing disc development. Through loss- and gain-of-function genetic screens, we identified the genes *gmd*, *MAP4K3*, *kurtz*, *kismet* and *spalt*, and subsequently characterised their requirements during wing development. The functional analysis we carried out consisted in the generation and analysis of loss-of-function conditions, the analysis of expression patterns using in situ hybridisation, and the determination of the sub-cellular localisation of the corresponding proteins. Our studies have established the participation of these genes in the signalling pathways Notch (*gmd*), Insulin (*Map4K3*), Hedgehog (*kurtz* and *kismet*) and TGF β (*spalt*).*

We expect that the analysis in Drosophila will uncover conserved aspects of the function of these genes, which would be relevant for normal development in vertebrates and might be related with the outcome of several human genetic disorders. Our laboratory also host two Ramon y Cajal contracts, Dr. Carlos Estella y Dra. Cristina Grande. They undertake independent projects related to pattern formation in Drosophila appendages (Dr. Carlos Estella) and body plan evolution in bilateral organisms (Dra. Cristina Grande).

Publicaciones / Publications

Glavic, A., López-Varea, A. and de Celis, J. F. (2011) The balance between GMD and OFUT1 regulates the activity of Notch signaling pathway by modulating the stability of Notch. *Biological Research* **44**, 23-32.

Resnik-Docampo, M. and de Celis, J. F. (2011) MAP4K3 is a component of the TORC1 signalling complex that modulates cell growth and viability in *Drosophila melanogaster*. *PLOS One* **6**: e14528 (1-14).

Molnar, C., Ruiz-Gómez, A., Martín, M., Rojo, S., Mayor, F. and de Celis, J. F. (2011) Role of the *Drosophila* non-visual b-Arrestin Kurtz in Hedgehog signalling. *PLOS Genetics* **7**(3): e1001335.

Teriente-Félix, A., Molnar, C., Gómez-Skarmeta, J.L. and de Celis, J. F. (2011) A conserved function of the chromatin ATPase Kismet in the regulation of hedgehog expression. *Dev. Biol.* **350**, 382-392.

Molnar, C., Resnik-Docampo, M., Organista, M. F., Martín, M., Hevia, C. F. and de Celis, J. F. (2011) Signalling Pathways in Development and Human Disease: A *Drosophila* Wing Perspective. Human Genetic Diseases, Dijana Plaseska-Karanfilska (Ed.), ISBN: 978-953-307-936-3, InTech.

Molnar, C., Casado, M., López-Varea, A., Cruz, C. and de Celis, J.F. (2012) Genetic annotation of gain-of-function screens using interference RNA and in situ hybridization of candidate genes in the *Drosophila* wing. *Genetics* **192**, 741-752.

Organista, M. and de Celis, J. F. (2012). The Spalt transcription factors regulate cell proliferation, survival and epithelial integrity downstream of the Decapentaplegic signalling pathway. *Biology Open* **0**, 1-12. doi: 10.1242/bio.20123038.

Jory, A., Estella C., Giorgianni, M.W., Slattery, M., Lavery, T.R., Rubin, G.M., Mann, R.S. (2012) A survey of 6,300 genomic fragments for cis-regulatory activity in the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Cell Rep.* **2**, 1014-1024.

Estella, C., Voutev, R., Mann, R.S. (2012) A dynamic network of morphogens and transcription factors patterns the fly leg. *Curr Op Dev Biol.*, **98**:173-198.

Grande, C. y Zardoya, R. (2012). Moluscos. En "El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos". Pablo Vargas y Rafael Zardoya (Eds.) Madrid.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Martín Resnik Docampo (2011). La proteína MAP4K3 participa, a través de mecanismos independientes, en la regulación de las rutas de señalización Tor y JNK. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José F. de Celis.

María Fernández Organista (2012). Funciones de las proteínas Spalt e identificación de sus genes diana durante el desarrollo del disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José F. de Celis.

Mecanismos de señalización en el desarrollo

Signaling mechanisms in development



Jefe de Línea / Group Leader:
Isabel Guerrero Vega

Científico Asociado /
Research Associated:
Nicole Gorfinkel Haim

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Ainoa Callejo del Prado
Ana Citlali Gradilla Castellanos

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Eléonor Simon
David Sánchez Hernández
João Ramalho Ortigão-Farias
Irene Seijo Barandearán
Julia Duque Lloredo
Jaime Jurado Gómez

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Carmen Ibáñez Pérez
M. Carmen Rodríguez-Navas
Laura González Méndez
Vanessa Sánchez Vaquero
Ana Barat Cascante

Estudiantes / Undergraduate
Students:
Rosana Faleiro Martín
Inés Vázquez de Castro

Científico visitante /
Visiting scientist:
Christos Delidakis

Resumen de investigación

Nuestro grupo estudia los mecanismos de señalización celular que controlan destinos celulares durante el desarrollo. Las moléculas de secreción perteneciente a las familias de TGF-beta, Wnt y Hedgehog (Hh) actúan como morfógenos durante el desarrollo en muchos contextos celulares, es decir, emanan desde focos localizados y forman gradientes de señalización celular dependiente de concentración. En los últimos años hemos dedicado una mayor atención al mecanismo de secreción y distribución extracelular de Hh. La proteína Hh está modificada por lípidos (colesterol y ácido palmítico) y sin embargo, señala a largo alcance, teniendo que existir un mecanismo celular que permite su liberación y movimiento a través del medio extracelular. El análisis funcional de varias proteínas que están implicadas en estos procesos, como son Dispatched, Ihog, Boi, los glicanos y Shifted/DmWif-1, sugiere que Hh se libera fundamentalmente a través de la membrana basolateral de los epitelios polarizados, previo a un proceso de reciclaje desde la parte apical a la basolateral (Fig. 1). Actualmente estamos investigando, a nivel celular, bioquímico y de análisis de imagen *in vivo*, la hipótesis de que Hh se libere en exovesículas unidas a unas extensiones celulares denominadas "citonemas" (Fig. 2).

Durante la morfogénesis, las células producen y experimentan fuerzas que generan movimiento y deformaciones para dar lugar las formas características de cada órgano. Estas actividades son el resultado de la interacción entre procesos bioquímicos y mecánicos. El grupo de Nicole Gorfinkel estudia el Cierre Dorsal, un proceso morfogenético que ocurre durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*. El Cierre Dorsal constituye un poderoso sistema modelo para explicar como tiene lugar el cierre del tubo neural y la cicatrización en vertebrados. En estos estudios se utiliza una combinación de microscopía *in vivo*, análisis cuantitativo del comportamiento molecular y celular y de generación de modelos biofísicos tanto en embriones silvestres como en embriones perturbados mediante métodos genéticos y mecánicos.

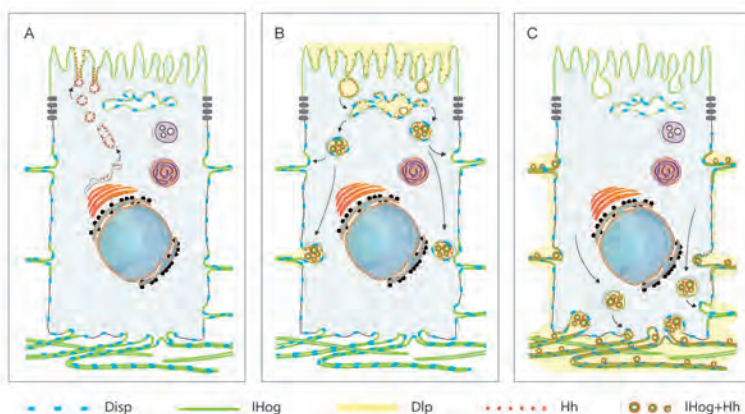


Figura 1. Modelo del procesamiento y liberación de Hh.

A) En las células productoras Hh se procesa, se modifica por lípidos y se externaliza a través de la membrana apical (bolas rojas). B) Hh posteriormente se endocita en las mismas células. En el compartimento endocítico Hh probablemente interacciona con Dispatched (línea discontinua azul), Dlp, Dally, Boi (fondo amarillo) y con Ihog (línea verde). Hh se transporta a la membrana basolateral dentro de cuerpos multivesiculares. C) Los cuerpos multivesiculares que contienen Hh se fusionan con la membrana plasmática basolateral para liberar los exosomas y formando a su vez extensiones celulares o "citonemas". Posteriormente Hh se transporta desde estas células a las células receptoras en exosomas y unidos a citonemas.

Figure 1. Model for processing and release of Hh.

A) In the producing cells Hh is translated, cleavage, lipid modified and externalized (red beads). B) Hh is then internalized and sorted to endosomes and to the apical recycling endosomes. In this process Hh probably interacts with Disp (blue discontinue line), Dlp, Dally, Boi (yellow background), and Ihog (green line). Hh is then transported to the basolateral membrane probably within multivesicular endosomes. C) These multivesicular endosomes fuse their membranes with the basolateral plasma membrane to form the cytonemes and release exovesicles. Hh is then transported in exovesicles to its target cells along cytonemes.

Research summary

Secreted signaling molecules of the TGF-beta, Wnt, and Hedgehog (Hh) families have been shown to play essential roles in cell fate specification during development. In many developmental contexts, they act as morphogens that emanate from localized sources and form extracellular gradients, which differentially regulate cell fates in a concentration-dependent manner. Our group is studying the function of these morphogens during *Drosophila* development with higher input in the molecular and cellular mechanisms of Hh signaling. Hh is a molecule highly modified by lipids, which confer to Hh a high affinity for cell membranes. Despite these modifications, Hh protein can signal to cells distant from the source of its production. Presently, we are analyzing how Hh is released and transported through the extracellular matrix. The functional analysis of several proteins with a possible function in this process, such as Ihog, Boi, Dispatched, glypicans, and Shifted/DmWif, suggest that Hh is released through the basolateral side of polarized epithelia, with a previous recycling process from apical to basolateral (Fig. 1). We are now working on the hypothesis that Hh is then transported in exovesicles attached to cellular extensions called "cytonemas" (Fig. 2).

During development, cells organize themselves to give rise to the characteristic 3D shapes of organs and organisms. In these morphogenetic processes, cells exert and respond to forces from their surroundings to generate motion and deformations. These activities result from a tight interplay between mechanics and biochemistry. To tackle this problem, Nicole Gorfinkel's group studies Dorsal Closure, a morphogenetic process during *Drosophila* embryogenesis, which is a model system for neural tube closure and wound healing in vertebrates. Using a combination of live imaging, quantitative analysis of molecular, and cellular behavior and biophysical modeling in wild type, as well as genetically and mechanically perturbed embryos Nicole Gorfinkel's group aims to understand how molecular dynamics generates tissue movements.

Publicaciones / Publications

Sánchez-Hernández, D., Sierra, J., Ortigão-Farias, J.R. and Guerrero, I. (2012). The WIF domain of the human and *Drosophila* Wif-1 secreted factors confers specificity for Wnt or Hedgehog. *Development* **139**(20):3849-58.

Rojas-Ríos, P., Guerrero, I. and González-Reyes, A. (2012). Cytoneme-mediated delivery of hedgehog regulates the expression of bone morphogenetic protein in stem cells in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **10**(4):e1001298.

Esteve, P., Sardonis, A., Ibáñez, C., Shimono, A., Guerrero, I., and Bovolenta, P. (2011). Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/β-catenin signalling activation in the vertebrate optic cup. *Development* **138**(19):4179-4184.

Callejo, A., Biloni, A., Mollica, E., Gorfinkel, N., Andrés, G., Ibáñez, C., Torroja, C., Doglio, L., Sierra, J., and Guerrero, I. (2011). Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the *Drosophila* wing disk epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(31):12591-12598.

Esteve, P., Sardonis, A., Cardozo, M., Malapeira, J., Ibáñez, C., Crespo, I., Marcos, S., Gonzalez-García, S., Toribio, M.L., Arribas, J., Shimono, A., Guerrero, I., and Bovolenta, P. (2011). SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nat Neurosci.* **14**(5):562-569.

Lada, K., Gorfinkel, N., and Martinez Arias, A. (2012). Interactions between the amnioserosa and the epidermis revealed by the function of the u-shaped gene. *Biol Open.* **1**(4):353-361.

Gorfinkel, N. and Blanchard, G.B. (2011). Dynamics of actomyosin contractile activity during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* **23**(5):531-539.

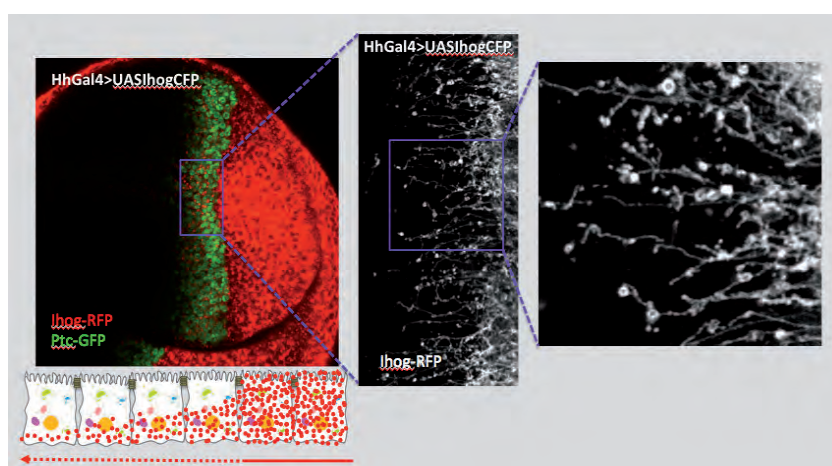
Mateus A.M., Gorfinkel N., Schamberg S., and Martinez Arias A. (2011). Endocytic and recycling endosomes modulate cell shape changes and tissue behaviour during morphogenesis in *Drosophila*. *PLoS One* **6**(4):e18729.

Gorfinkel N., Schamberg S., and Blanchard G.B. (2011). Integrative approach to morphogenesis: lessons from dorsal closure. *Genesis* **49**(7):522-33.

Blanchard GB, Murugesu S, Adams RJ, Martinez-Arias A, and Gorfinkel N. (2010). Cytoskeletal dynamics and supracellular organisation of cells shape fluctuations during dorsal closure. *Development* **137**(16):2743-52.

Figura 2. Coexpresión de Ihog-RFP y Hh-GFP en el epitelio del disco imaginal de ala. Se puede observar que en el disco imaginal de ala, Hh forma parte de exovesículas y de extensiones celulares o filopodios, también denominados "cytonemas".

Figure 2. Ihog-RFP and Hh-GFP protein expression in the wing imaginal disc epithelium. Note that Hh-GFP is located in filopodia extensions, also called "cytonemes", and exovesicles in the wing imaginal disc.



Especificación de destinos neuronales en el sistema nervioso central de *Drosophila*

Specification of Neuronal Identities in the *Drosophila* Central Nervous System

Jefe de Línea / Group Leader:
Fernando Jiménez Díaz-Benjumea

Personal Científico / Scientific Staff:
Pilar Herrero Solans

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Alicia Estacio Gómez
Marta Moris Sanz
Javier Álvarez Rivero

Resumen de investigación

Durante el desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila*, las células progenitoras neuronales, los neuroblastos, se dividen asimétricamente para generar neuronas y auto-regenerarse. En este proceso los neuroblastos atraviesan una serie de ventanas temporales que definen el destino de las distintas neuronas que se generan. Estas ventanas temporales están definidas por la expresión temporal de un conjunto de factores de transcripción. Al mismo tiempo, la expresión de los genes HOX, a lo largo del eje anteroposterior del embrión, genera diversidad en los diferentes segmentos. Nuestro objetivo es entender los mecanismos por los que los genes Hox y los factores temporal interactúan para definir el código combinatorial de factores de transcripción que especifica el destino de las diferentes neuronas. Nuestro sistema modelo es dos conjuntos de neuronas que se caracterizan por la expresión de los neuropéptidos Leucoquinina y CCAP (Figura 1).

Al final de la neurogénesis embrionaria, los neuroblastos, bien mueren por apoptosis o entran en quiescencia. Más tarde en el desarrollo, en estadios larvarios, los neuroblastos reanudan la proliferación y generan, en una segunda neurogénesis, el sistema nervioso del adulto. Poco se sabe acerca de los mecanismos que controlan la entrada en quiescencia y el mantenimiento del destino celular durante la quiescencia (Figura 2). En los segmentos abdominales sólo 3 de los 30 neuroblastos presentes en cada hemisegmento experimentan quiescencia, el resto muere por apoptosis. Hemos elegido los neuroblastos abdominales como sistema modelo para estudiar en primer lugar, cómo estos dos destinos están regulados genéticamente y en segundo lugar, cuáles son los cambios celulares que implican la entrada en quiescencia.

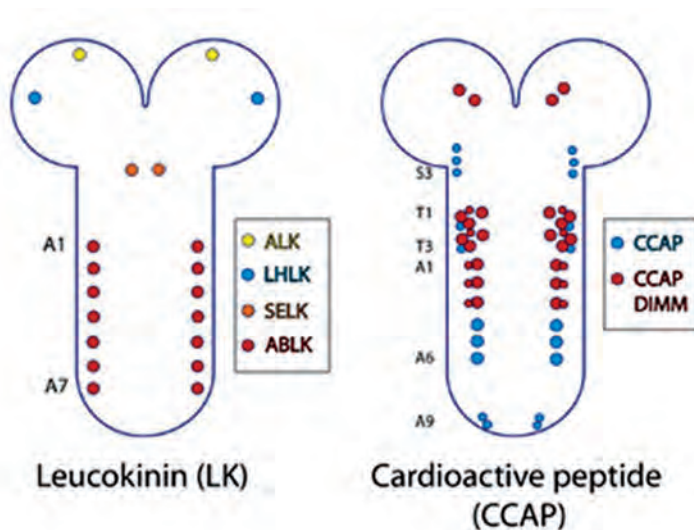


Figura 1. Patrón de expresión de los péptidos Leucoquinina y CCAP en el sistema nervioso central de *Drosophila*.

Figure 1. Pattern of expresión of Leukoquinin and CCAP in the *Drosophila* central nervous system.

Research summary

During the development of the Drosophila central nervous system neural stem cells, neuroblasts, divide asymmetrically to generate neurons and self-regenerate. In this process neuroblasts go through a series of temporal windows that define the fate of distinct neurons. These temporal windows are defined by the temporal expression of a set of transcription factors. Simultaneously, the expression of the HOX genes, along the anterior posterior axis of the embryo, generates diversity in the different segments. Our goal is to understand the mechanisms by which the HOX genes and the temporal factors interplay to define the combinatorial code of transcription factors that specify the fate of the different neurons. Our model systems are two sets of neurons characterized by the expression of neuropeptides Leucokinin and CCAP (Figure 1).

At the end of the embryonic neurogenesis, neuroblasts either die by apoptosis or enter quiescence. Later in larval stages, neuroblasts resume proliferation and generate, in a second neurogenesis, the adult nervous system. Little is known about the mechanisms controlling entry into quiescence and maintenance of cell fate during quiescence. In abdominal segments only 3 out of 30 neuroblasts per hemisegment undergo quiescence, the rest die by apoptosis. We chose abdominal neuroblasts as model system to study first, how these two fates are genetically regulated, and secondly, which are the cellular changes involving the entry into a quiescence stage.

Publicaciones / Publications

López-Arias, B., Dorado, B. and Herrero, P. (2011) Blockade of the release of the neuropeptide leucokinin to determine its possible functions in fly behavior: chemoreception assays. *Peptides* **32**, 545-552.

Herrero, P. (2012) Fruit fly behavior in response to chemosensory signals. *Peptides* **38**, 228-237.

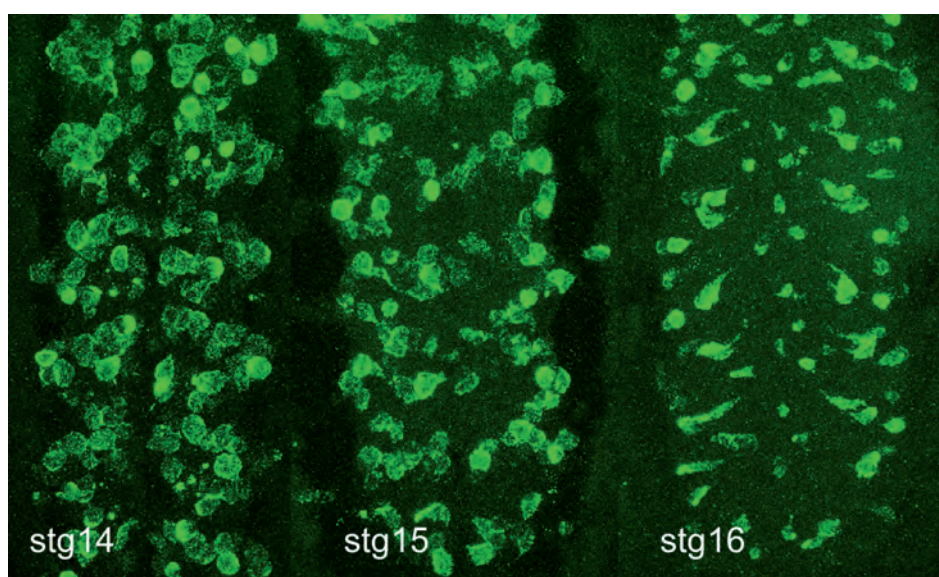


Figura 2. A la entrada en quiescencia los neuroblastos sufren un marcado cambio de forma, aquí detectado por inmunomarcado en los estadios 14, 15 y 16 de la embriogénesis.

Figure 2. Upon entering quiescence neuroblasts undergo marked changes in shape, here detected by immunostaining in stages 14, 15 and 16 of embryogenesis.

Control genético de la morfogénesis

Genetic control of morphogenesis

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Ginés Morata Pérez

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Manuel Calleja Requena

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Raquel Martín Palomeque
Carlos García Arques
Noelia Pinal Seoane

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Luna Ballesteros Arias
Salvador Cenador Herrera
María Martín Montero

Eugeny Shlevkov
Javier Menéndez González
Antonio José Montes Ruiz

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Angélica Cantarero Mateo
Rosa M^a González Herrera

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Miguel Ramírez Moreno

Resumen de investigación

Como en años anteriores la actividad del laboratorio se ha centrado en el estudio de la función apoptótica en *Drosophila* y en el análisis de los mecanismos implicados en la formación de tumores, con especial énfasis en el fenómeno de competición celular. Nuestros estudios sobre la respuesta apoptótica a stress han demostrado que existe un bucle de amplificación en la respuesta sin el cual la apoptosis se aborta y no se produce muerte celular. Hemos identificado dos factores directamente involucrados en la amplificación, el gen dp53 (el homólogo en *Drosophila* de p53 en mamíferos) y la vía JNK (Jun-N Terminal Kinase). Los resultados sugieren que el modelo de apoptosis en bucle que hemos propuesto tiene una validez general y es aplicable a la apoptosis en vertebrados.

Con respecto a los mecanismos de formación de tumores, hemos analizado el comportamiento de células mutantes para rab5, un gen necesario para la endocitosis y del que se sabía que sus mutaciones dan lugar a crecimientos tumorales. Hemos demostrado que a pesar de su potencial tumoral las células mutantes rab5 son eliminadas por competición celular, pero que cuando se agrupan en un grupo suficientemente grande (unas 500) son capaces de evadir la competición celular y formar un tumor neoplásico. Este fenómeno de "protección de grupo" es novedoso y explica el comportamiento de varias otras mutaciones oncogénicas de *Drosophila*.

Finalmente, durante el periodo 2011-2012 se ha iniciado en el laboratorio una nueva línea de investigación sobre los mecanismos de regeneración en los discos imaginales de *Drosophila*. Hemos desarrollado métodos de inducción de muerte celular masiva y posterior regeneración de determinados dominios del disco de ala. Los resultados indican que la respuesta regenerativa es inmediata al daño e implica una alteración de la función de los genes responsables del mantenimiento de la identidad celular.

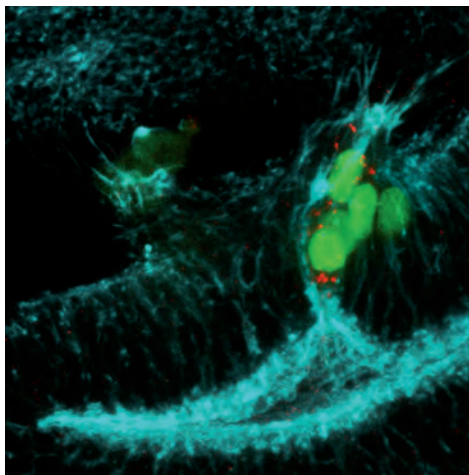


Figura 1. Disco de ala de *Drosophila* que contiene un clon (verde) deficiente para los genes pro-apoptóticos y que sobreexpresa la vía JNK. Las células del clon sintetizan metaloproteasa 1 (rojo), que degrada la matriz extracelular. Se observan protrusiones de F-actina (azul) en la región basal de las células.

Figure 1. *Drosophila* wing disc containing a marked clone (green) deficient for the pro-apoptotic genes and overexpressing the JNK pathway. The cells of the clone express the metalloprotease 1, which degrades extracellular matrix. Note the presence of F-actin protrusions (blue) at the basal region of the cells.

Research summary

As in previous years the work in the lab has been focused on two research lines: the analysis of apoptosis in *Drosophila*, and the study of mechanisms implicated in tumour formation, with special emphasis in the role of cell competition. Regarding the apoptosis program, we have shown that there is an amplification loop in stress-induced apoptosis. This loop is critically required for the execution of the apoptosis program because in its absence the amount of cell death is greatly diminished. Two key factors in the establishment of the apoptotic loop are the gene *dp53* (the *Drosophila* homologue of the mammalian *p53*) and the *JNK* (Jun-N Terminal Kinase) pathway. The results indicate that this model may have a general validity and is applicable to apoptosis in vertebrates.

Regarding the mechanisms of tumour formation, we have analysed in detail the behaviour of imaginal cells mutant for *rab5*, a gene required for endocytosis. Previous reports have shown that *rab5* mutations are able to generate extensive tumours in the imaginal discs. Our results indicate that in spite of their tumorigenic potential mutant *rab5* cells are eliminated by cell competition. However, when mutant cells merge in a sufficiently large group (about 500) they can evade cell competition and form a neoplastic tumour. This "group protection" phenomenon is novel and explains the behaviour of several oncogenic mutations in *Drosophila*.

Finally, during the 2011-2012 period we have initiated a new research line to study the mechanisms of regeneration in the imaginal discs. We have developed the methods to induce massive cell death and subsequent regeneration of distinct domains of the wing disc. The results indicate that the regenerative response is immediate to the damage and involves an alteration in the function of the genes responsible for the maintenance of cellular identity.

Publicaciones / Publications

Morata, G. Shlevkov, E. and Perez-Garijo, A. (2011) Mitogenic signalling from apoptotic cells in *Drosophila*. *Development, Growth and Differentiation* **53**, 168-176.

Shlevkov, E. and Morata, G. (2012) A p53-JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* **19**, 451-460.

Mollereau, B. Perez-Garijo, A. Bergmann, A. Miura, M. Gerlitz, O. Ryoo, H.D. Steller, H. and Morata, G. (2012) Compensatory Proliferation and Apoptosis-Induced Proliferation: A need for clarification. *Cell Death & Differentiation* 1-2.

Peralta, S., Clemente, P., Sánchez-Martínez, A., Calleja M., Hernández-Sierra, R., Matsushima, Y., Adán, C., Ugalde, C., Fernández-Moreno, M.A., Kaguni, L.S., and Garesse, R. (2012) Coiled coil domain-containing protein 56 (CCDC56) is a novel mitochondrial protein essential for cytochrome c oxidase function. *J Biol Chem.* **13**; 287(29):24174-24185.

Sánchez-Martínez, A., Calleja, M., Peralta, S., Matsushima, Y., Hernández-Sierra, R., Whitworth, A.J., Kaguni, L.S., and Garesse, R. (2012) Modeling pathogenic mutations in *Drosophila* suggests an apoptosis role in response to mitochondrial defects. *PLoS One* **7**(8):e43954.

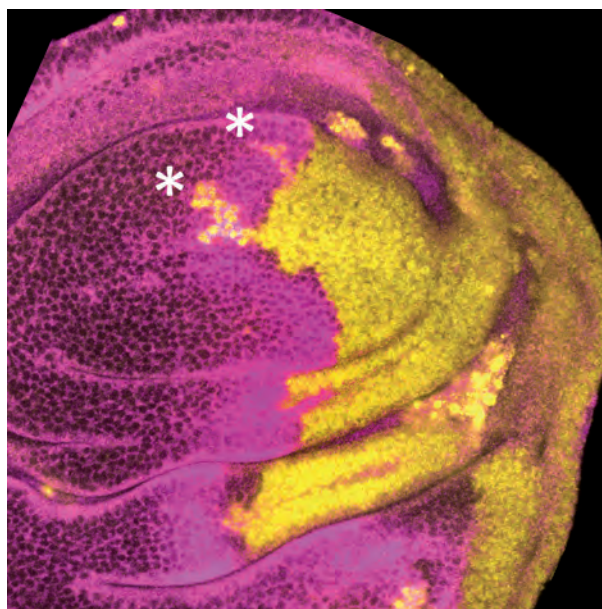
Tesis doctorales / Doctoral theses

Evgeny Shlevkov (2011) Nuevos mecanismos de regulación de la apoptosis en *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Ginés Morata Pérez.

Javier Ménendez González (2011) Competición celular y desarrollo de tumores en discos imaginales de *Drosophila*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Ginés Morata Pérez.

Figura 2. Disco imaginal de ala en el que las células del compartimento posterior (parte derecha) han sufrido un tratamiento de 2 días de inducción de apoptosis y 3 de recuperación. Las células pertenecientes al linaje posterior están marcadas en amarillo, mientras que en magenta se marcan las células del compartimento anterior. Nótese la presencia de grupos de células (asteriscos) que habiéndose originado en el compartimento posterior ahora forman parte del compartimento anterior. Este resultado sugiere que el tratamiento de ablación provoca un colapso transitorio del borde de compartimentos acompañado de un cambio de identidad celular.

Figure 2. Wing imaginal disc in which posterior compartment cells (right side) have suffered a treatment of 2 days of apoptosis induction followed by 3 days of recovery. The cells belonging to the posterior lineage are labeled in yellow, while the anterior compartment is labeled in magenta. Note the presence of groups of cells (asterisks) that were originated in the posterior compartment and now belong to the anterior compartment. This result suggests that the ablation treatment provokes a transient collapse of the compartments boundary and a change in cell identity.



Función y mecanismo de acción de las caderinas atípicas durante el desarrollo de *Drosophila*

Functional analysis and molecular mechanism of atypical cadherins during Drosophila development



Jefe de Línea / Group Leader:
Isabel Rodríguez Enríquez

Predotorales /
Graduate Students:
Eva Revilla Yates

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Laura Varas

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Natalia Sánchez Romero (2011)
Daniel Ubierna Hernández (2012)

Científico visitante / Visiting scientist:
Dr. Javier Sierra Isturiz

Resumen de investigación

Las caderinas Dachsous y Fat son componentes esenciales del mecanismo de Polaridad Planar (PP) que regula el tamaño y la forma de los órganos en los organismos multicelulares.

Utilizando como modelo la mosca *Drosophila melanogaster*, nuestro grupo estudia la vía de Dachsous/Faty el/los mecanismo/s de acción durante el control de la PP, la proliferación celular y la formación de patrón.

Actualmente estamos desarrollando los siguientes proyectos:

- Caracterización estructural del gen dachsous. Hemos identificado nuevas isoformas de dachsous reguladas a nivel transcripcional por elementos "enhancer" que mapean en las regiones intrónicas. Para estudiar su relevancia funcional nos proponemos: a) identificar dominios conservados en la región citoplásmica mediante análisis bioinformático, b) Búsqueda de proteínas que interaccionan con la región citoplasmática.

- Función de Dachsous en el desarrollo del órgano auditivo.

Los órganos auditivos son estructuras mecanosensoriales especializadas que derivan de un ancestro común. Los genes que participan en las etapas del proceso auditivo están también conservados evolutivamente. En *Drosophila*, el órgano de Johnston lleva a cabo la función auditiva. Nuestros datos indican que Dachsous participa en la formación de este órgano. También hemos identificado nuevos genes regulados por Dachsous que participan en este proceso.

- Análisis molecular de los homólogos de Dachsous en vertebrados.

La función auditiva en vertebrados depende de la correcta organización de los estereocilios en el oído interno que está regulada por la PP. Existen tres genes similares a Dachsous: dachsous1, dachsous2 y CDH23. Estamos realizando la caracterización molecular de Dachsous2. Mediante análisis de Northern y RT-PCR encontramos diferentes isoformas que se expresan durante el desarrollo del oído interno de ratón y pollo. Estudiamos la distribución espacio-temporal de las distintas isoformas y su función durante la formación del oído interno.

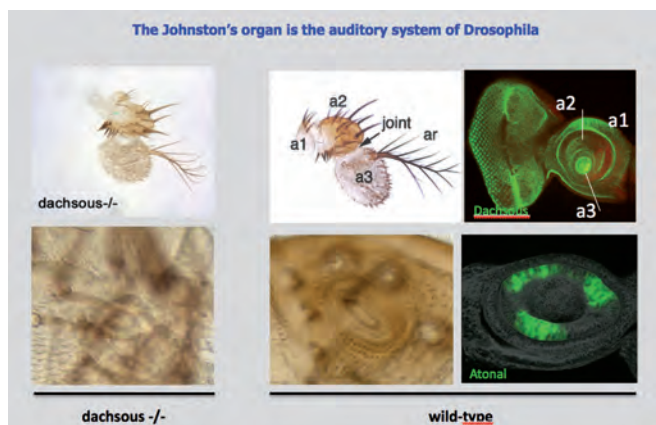


Figura 1. Expresión de Dachsous en el disco imaginal de ojo-antena de *Drosophila*. Alteraciones en la antena y el órgano de Johnston en mutantes dachsous.

Figure 1. Dachsous expression in the *Drosophila* eye antennal disc. Phenotypic alterations observed in adult antenna and Johnston's organ of dachsous mutants.

Research summary

The atypical cadherins *Dachsous* y *Fat* are essential components of planar cell polarity (PCP), one mechanism by which organisms control the organ shape and size. Using *Drosophila melanogaster* as animal model we study whether one or more *Dachsous*/*Fat* molecular mechanisms are involved in the regulation of PCP, cell proliferation and patterning.

We currently have the following goals:

- Structural characterization of *Dachsous* gene. Using a comprehensive analysis at the molecular level we have identified novel *Dachsous* transcriptional isoforms regulated by “enhancer” elements located within the intronic regions of the gene. To study their functional relevance we will: a) identify conserved domains in the cytoplasmic region using bioinformatic tools, b) search for proteins that interact with the cytoplasmic region.

- Function of *Dachsous* during the auditory organ development.

The hearing organs are specialized mechanosensory structures that derive from a common ancestor. Genes involved in hearing are also evolutionarily conserved. In *Drosophila*, the Johnston’s organ holds hearing function. We showed that *Dachsous* is necessary for its formation participating at different levels during this process. We are studying the role of novel genes regulated by *Dachsous*.

- Molecular Analysis of the vertebrates *Dachsous* homologs.

In vertebrates normal hearing requires proper stereocilia organization that is coordinated by PCP. There are three genes with similarities to *Dachsous*: *dachsous1*, *dachsous2* and *CDH23*. We have started the molecular characterization of *Dachsous2*. By RT-PCR and Northern we have identified several *Dcsh2* transcriptional isoforms expressed in the mouse cochlea. We study their spatio-temporal distribution and their role during the inner ear formation.

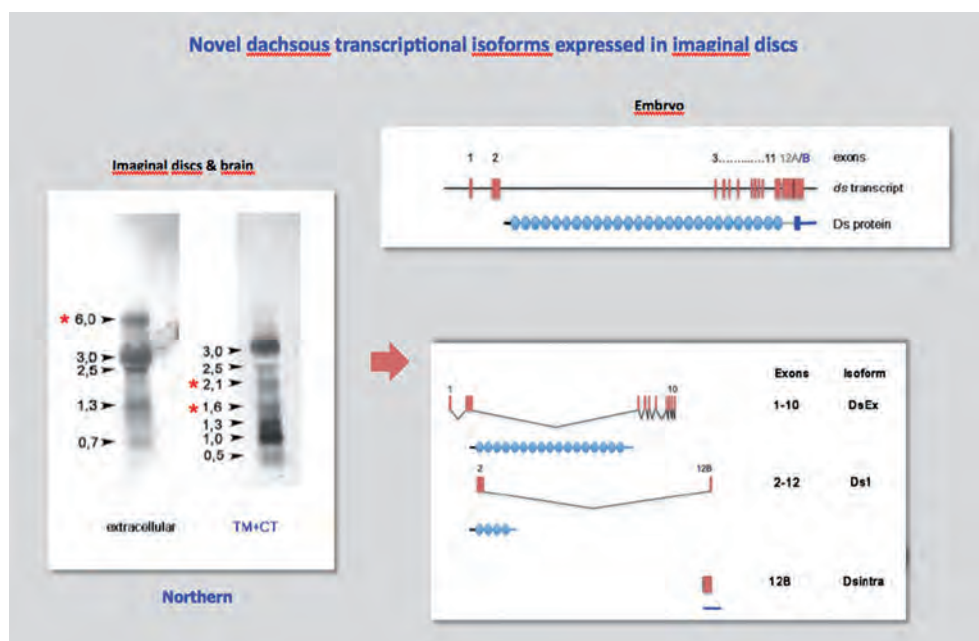


Figure 2. Northern blot con los nuevos transcritos de *ds* expresados en discos imaginales y cerebro. Esquema con la estructura de tres isoformas *Dachsous* caracterizadas.

Figure 2. Northern blot showing the novel *ds* transcript isoforms expressed in imaginal disc and brain. Drawing showing the structure of three *Dachsous* isoforms characterized.

Genética del desarrollo de derivados mesodérmicos en *Drosophila*: sistemas muscular y de filtración

Developmental biology of mesoderm derivatives: muscular and filtration systems



Jefe de Línea / Group Leader:
Mar Ruiz Gómez

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Marta Carrasco Rando
Antonio Sobrado de Vicente-Tutor
Silvia Prieto Sánchez (hasta Febrero de 2012)

Técnico de Investigación / Technical Assistance:
Sonia Velázquez Beltrán

Estudiantes / Undergraduate Students:
Irene Bodega Mayor
Alexandra Atienza Manuel

Resumen de investigación

Nuestro grupo está interesado en el estudio del desarrollo de los sistemas muscular y de filtración en condiciones fisiológicas y de sus alteraciones en condiciones patológicas, usando como modelo la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. Para ello nos centramos en dos objetivos principales: (1) analizar la contribución de las diferentes poblaciones de mioblastos a la regulación de las distintas etapas de la miogénesis, y (2) llevar a cabo el análisis funcional de los componentes del diafragma de filtración de los nefrocitos.

Durante los dos últimos años hemos realizado el análisis funcional de los genes del complejo Iroquois, *araucan* (*ara*) y *caupolican* (*caup*) en el mesodermo. Estos genes se expresan en un grupo reducido de mioblastos fundadores donde se requieren para conferir el destino muscular Lateral Transverso. Hemos establecido que la implementación de dicho destino requiere la represión mediada por las homeoproteínas Ara y Caup de genes de identidad muscular y que la capacidad represora de las proteínas IRO depende de la actividad de la ruta de señalización de Ras/MAPK. Además hemos seguido avanzado en la caracterización funcional de varios genes específicos de mioblastos fundadores y competentes en fusión.

Asimismo, hemos mostrado que la homología entre el diafragma de filtración glomerular de los podocitos renales y el diafragma de filtración de *Drosophila* también se extiende a los procesos de regulación por modificaciones post-traduccionales de los principales componentes de estos complejos multiproteicos. Estamos estudiando las rutas de señalización de Duf/Sns en los nefrocitos y validando el uso de los mismos como un modelo experimental idóneo para el estudio de distintas nefropatías.

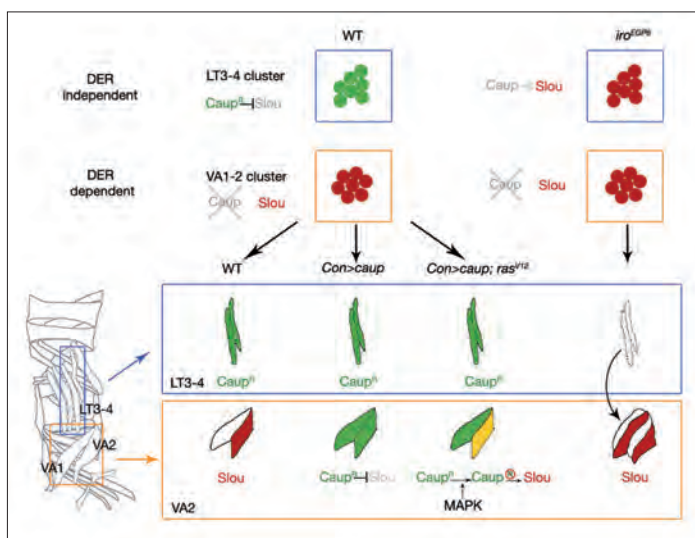


Figura 1. Efecto del estado de activación de la ruta de señalización Ras/MAPK sobre la regulación de *slouch* por Araucan/Caupolican en los linajes musculares lateral transverso (LT) y ventral agudo (VA).

Figure 1. Effect of the activation state of the Ras/MAPK signalling pathway on the Ara/Caup-mediated regulation of *slouch* in the lateral transverse (LT) and ventral acute (VA) muscle lineages.

Research summary

The main aim of our research group is to understand the development of the muscular and filtration systems during normal and pathological conditions using *Drosophila melanogaster* as model organism. In order to achieve this goal we have focussed our research in two main areas: (1) to study the contribution of the main myoblast populations to the control of myogenesis, and (2) to undertake the functional analysis of the filtration diaphragm components in nephrocytes.

During the last two years we analysed the role of the Iroquois gene complex members, *araucan* (*ara*) and *caupolican* (*caup*) in myogenesis. *Iro* genes are expressed in a subset of founder myoblasts where they contribute to the acquisition of the lateral transverse (LT) muscle fate. We demonstrated that the implementation of the LT fate requires the Ara/Caup-mediated repression of different muscle identity genes in the respective muscle founders, and that the repressor activity of *IRO* homeoproteins depends on the activity of the Ras/MAPK signalling pathway. We have also advanced in the functional characterization of additional founder and myoblast-competent specific genes.

In addition we established that the similarities between the podocyte and the nephrocyte slit diaphragms expands to the conservation of the regulatory mechanisms controlling the stability of the main diaphragm components. We are studying the function of *Duf* and *Sns* signalling pathways in nephrocytes and validating the use of nephrocytes as an experimental model to study nephropathies.

Publicaciones / Publications

Carrasco-Rando, M., Tutor, A.S., Prieto-Sánchez, S., González-Pérez, E., Barrios, N., Letizia, A., Martín, P., Campuzano, S. and Ruiz-Gómez, M. (2011) *Drosophila* Araucan and Caupolican integrate intrinsic and signalling inputs for the acquisition by muscle progenitors of the lateral transverse fate. *PLoS Genetics* 7 (7), e1002186 (1-13).

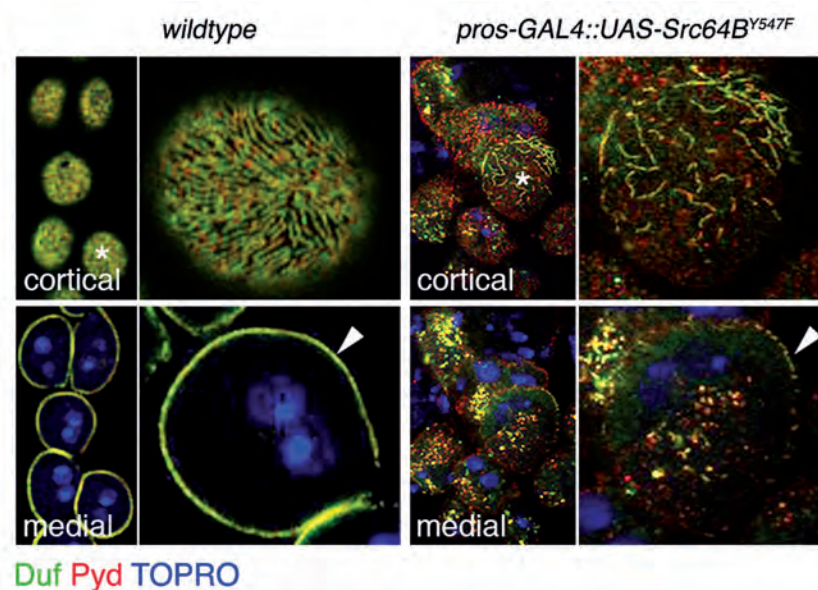


Figura 2. La hiperactividad de la Src kinasa Src64B induce la deslocalización del complejo Dumbfounded/Polychateoid de la membrana de los nefrocitos (cabeza de flecha) y la aglutinación de los mismos.

Figure 2. Hyperactivation of Src64B induces delocalization of Dumbfounded/Polychateoid complexes from the nephrocyte membrane (arrowhead) and nephrocyte agglutination.

Especificación segmental y formación de patrón en *Drosophila**Segmental specification and pattern formation in Drosophila*

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Ernesto Sánchez-Herrero Arbide

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
José de Las Heras Chanes
Ana Guarnier Peralta
Daniel López Garaulet
Jesús Romero Pozuelo

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Delia del Saz Soler
Rafael Alejandro Juárez Uribe
Inés Olivera Crego
Jesús Rodríguez Curt

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Paloma Martín Fernández

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Miguel Rovira del Olmo
Antonio Tarruell Pellegrin

Resumen de investigación

En los últimos años hemos investigado la función de los genes Hox en la determinación de la forma y el tamaño de distintos órganos de *Drosophila*. El gen Hox *Abdominal-B* (*Abd-B*) se requiere, en combinación con cofactores como *Extradenticle* y *Homothorax* y con la ruta de determinación sexual, para la supresión del segmento abdominal séptimo en los machos y para controlar el crecimiento del segmento octavo en la genitalia femenina. Estas funciones las realiza regulando genes como *extramacrochetae* y *spitz* (ligando de la vía EGFR) en el abdomen, o controlando vías de señalización como las de *Decapentaplegic* y *Hippo* en el disco genital. La relación entre *Abd-B* y sus cofactores en el desarrollo de estas mismas estructuras se está estudiando en detalle mediante el análisis de la funcionalidad de proteínas *Abd-B* mutadas en dominios conservados. El gen *Abd-B* se requiere asimismo para diferentes aspectos funcionales de la genitalia del macho, y se están analizando los mecanismos que determinan dichas funciones. Por otra parte, se está analizando el papel del gen Hox *Ultrabithorax* (*Ubx*) en determinar el crecimiento del tercer segmento torácico y en definir la forma de los halterios, apéndices dorsales de este segmento. La forma globosa de estos apéndices parece necesitar una regulación precisa, por parte de *Ubx*, de la cantidad de matriz extracelular.

Otra parte de nuestra investigación se centra en estudiar el desarrollo de las uniones entre segmentos tarsales de las patas de *Drosophila*, como modelo de organogénesis, y para cuya formación se requiere la vía de Notch y la muerte celular. Hemos descubierto que un intermediario en la función de Notch es el gen *zinc finger homeodomain-2*, que también regula la muerte celular. Igualmente se analiza el papel de la miosina, y cómo se activa, durante el desarrollo de estas uniones.

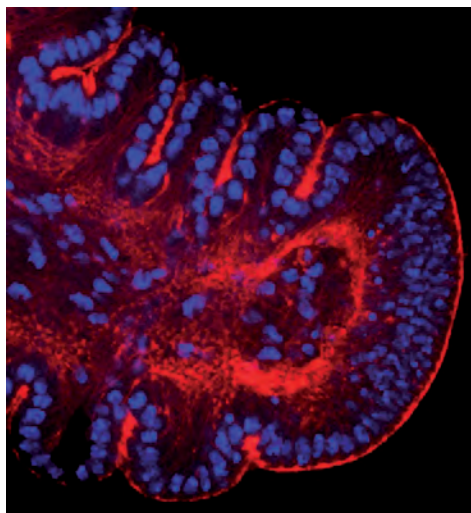


Figura 1. Parte distal de un disco imaginal de pata de *Drosophila* marcado con faloidina (rojo) y Topro (azul).

Figure 1. Distal part of a *Drosophila* leg imaginal disc labelled with phalloidine (red) and Topro (blue).

Research summary

In the past years we have studied the function of Hox genes of *Drosophila* in determining form and size of different structures. The Hox gene *Abdominal-B* (*Abd-B*) is needed, along with Hox cofactors like *Extradenticle* and *Homothorax* and the sex determination pathway, to suppress the development of the male seventh abdominal segment and to regulate the growth of the eighth segment in the female genitalia. *Abd-B* controls these functions by governing genes like *extramacrochetae* and *spitz* (a ligand of the EGFR pathway) in the male abdomen or by controlling the *Decapentaplegic* and *Hippo* pathways in the genital disc. The relationship between *Abd-B* and its cofactors in the development of these structures is being analyzed in detail by studying the function of *Abd-B* proteins mutated in conserved residues and protein motifs. *Abd-B* is also needed for the correct formation and function of the male genitalia and we are investigating the mechanisms required for such functions. We are also studying the role of the *Ultrabithorax* (*Ubx*) gene in determining the growth of the third thoracic segment and in defining the shape of the halteres, dorsal appendages of this segment. The global form of the halteres seems to require a precise control of the amount of extracellular matrix by *Ubx*.

Another part of our research is focused in studying the formation of *Drosophila* tarsal leg joints, as an organogenesis model, and which requires Notch activity and apoptosis. We have found out that an intermediate in the activity of Notch is the gene zinc finger homeodomain-2, which also regulates cell death. We are also analyzing the role of myosin, and how it is activated, in the development of these joints.

Publicaciones / Publications

de Navas, L. F., Reed, H., Akam, M., Barrio, R., Alonso, C. R. y Sánchez-Herrero, E. (2011). Integration of RNA processing and expression level control modulates the function of the *Drosophila* Hox gene *Ultrabithorax* during adult development. *Development* **138**, 107-116.

Foronda, D., Martín, P y Sánchez-Herrero, E. (2012). *Drosophila* Hox and sex-determination genes control segment elimination through EGFR and *extramacrochetae* activity. *PLoS Genetics* **8**, e1002874.

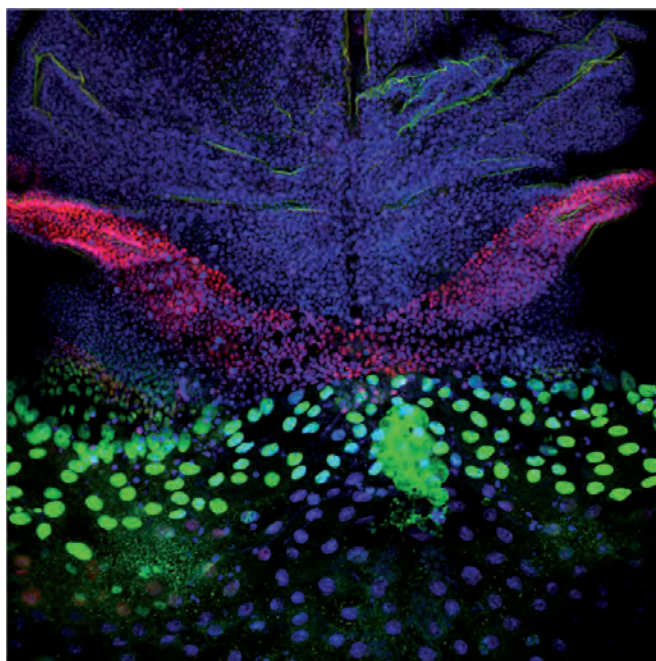
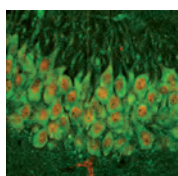
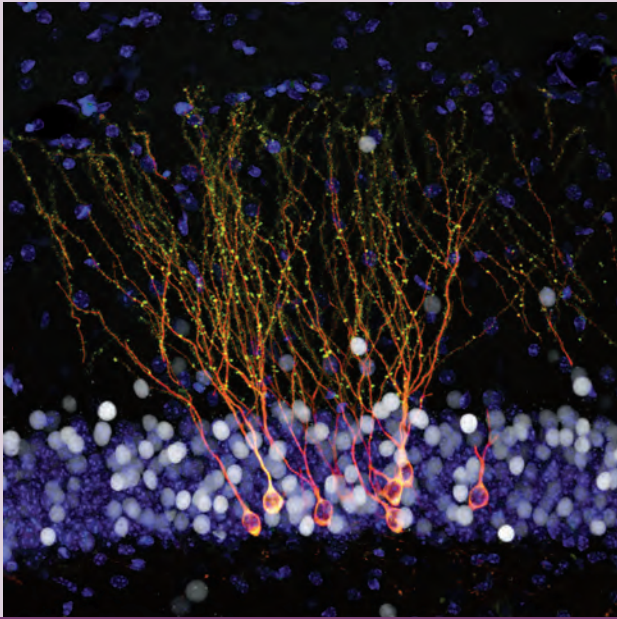


Figura 2. Imagen del notum y abdomen anterior de una pupa de *Drosophila* mostrando la expresión de hedgehog (rojo) y Ultrabithorax (verde). Topro está en azul.

Figure 2. Part of the notum and anterior abdomen of a *Drosophila* pupa showing expression of hedgehog (red) and Ultrabithorax (green). Topro is in blue.

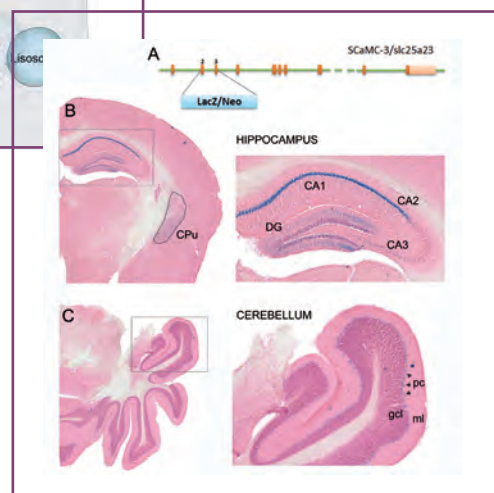
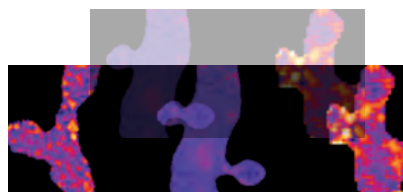
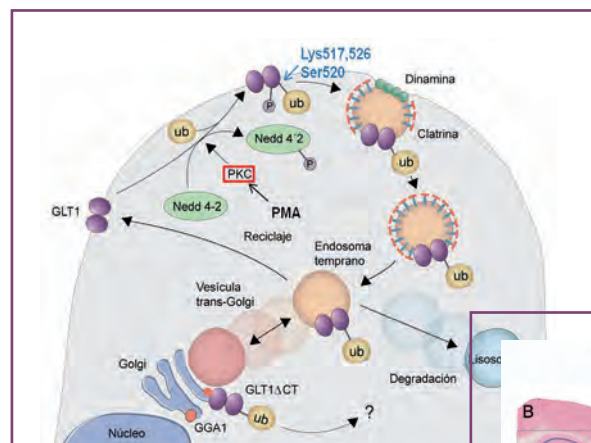
116	Fisiopatología de los transportadores de glicina en la neurotransmisión glicinérgica: hiperplexia y dolor <i>Physiopathology of glycine transporters in glycinergic neurotransmission: hyperekplexia and pain</i> Carmen Aragón Rueda
118	Función de las proteínas microtubulares en neuronas <i>Function of microtubular proteins in neurons</i> Jesús Ávila de Grado
120	Fisiopatología y Terapia de las Enfermedades Neurodegenerativas: Ataxia de Friedreich <i>Physiopathology and Therapy of Neurodegenerative Diseases: Friedreich's Ataxia</i> Javier Díaz Nido
122	Bases Moleculares de la Plasticidad Neuronal <i>Molecular Bases of Neuronal Plasticity</i> Fco. Javier Díez Guerra
124	Disfunción Neuronal durante el envejecimiento <i>Neuronal Dysfunction during aging</i> Carlos Dotti
126	Mecanismos moleculares y celulares de la plasticidad sináptica <i>Molecular and cellular mechanisms for synaptic plasticity</i> José Antonio Esteban García
128	Bases moleculares de las sinápsis glutamatérgicas <i>Molecular bases of glutamatergic synapses</i> Cecilio Giménez Martín / Francisco Zafra
130	Lípidos en la fisiología y patología neuronal <i>Lipids in neuronal physiology and pathology</i> María Dolores Ledesma Muñoz
132	Enfermedad de Huntington y otras enfermedades del sistema nervioso central <i>Huntington's disease and other CNS disorders</i> José Lucas
134	Biología de células troncales neurales humanas. Potencial para reposición celular y terapia génica en neurodegeneración <i>Biology of human neural stem cells. Potential for cell and gene therapy in neurodegeneration</i> Alberto Martínez Serrano
136	Señalización mitocondrial del calcio y señalización de insulina/leptina en envejecimiento <i>Calcium signalling in mitochondria and insulin/leptin signalling during ageing</i> Jorgina Satrustegui Gil-Delgado
138	Bases genéticas de la enfermedad de Alzheimer: Estudio genómico de modelos celulares patogénicos <i>Genetic bases of Alzheimer's Disease: Genomic study of pathogenic cell models</i> Fernando Valdivieso / María Jesús Bullido
140	Mecanismos moleculares de neurodegeneración y regeneración <i>Molecular mechanism of neurodegeneration and regeneration</i> Francisco Wandosell Jurado





NEUROBIOLOGÍA MOLECULAR

Molecular Neurobiology



Fisiopatología de los transportadores de glicina en la neurotransmisión glicinérgica: hiperplexia y dolor

Physiopathology of glycine transporters in glycinergic neurotransmission: hyperekplexia and pain



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Carmen Aragón Rueda

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Beatriz López-Corcuera

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Esperanza Jiménez Martínez (2011)

Predoctorales / *Predocctoral Fellows:*
Gonzalo Pérez Siles (2011)
Jaime de Juan Sanz
Esther Arribas González
Lucía Villarejo López

Técnico de investigación /
Technical Assistance:
Enrique Núñez Balbuena

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Iván Menéndez Montes (2011-2012)
Cristina Benito Muñoz

Resumen de investigación

Nuestro interés es el estudio del mecanismo funcional, biogénesis, tráfico intracelular y regulación de los transportadores de glicina, GlyTs (GlyT1 y GlyT2) del SNC, proteínas de la membrana plasmática de neuronas y astrocitos responsables de la finalización de la transmisión glicinérgica inhibitoria. Nuestra investigación está orientada a patologías del SNC de mamíferos asociadas a disfunciones de las vías glicinérgicas, principalmente alteraciones neuromusculares como la hiperplexia hereditaria humana y dolor neuropático. Mutaciones en el gen de GlyT2 (SLC6A5) son causantes de la hiperplexia humana y la distonía muscular congénita tipo 2 en terneros.

Mediante estudios estructurales y dinámicos utilizando modelos 3D de GlyTs, que hemos generado y validado experimentalmente en colaboración con el Dr. Antonio Morreale (Unidad de Bioinformática del CBMSO), hemos identificado una región en el vestíbulo extracelular de GlyT2 implicada en la selectividad de cationes y en el mecanismo de acoplamiento del transporte de glicina.

Nos interesa el estudio del tráfico intracelular de GlyT2 en la terminal sináptica por ser un mecanismo fundamental en el control de la actividad glicinérgica ya que proporciona una forma rápida para modular la actividad del transportador en la superficie celular. Hemos descrito los mecanismos moleculares de endocitosis constitutiva y regulada por PKC a través de los cuales GlyT2 recicla entre la superficie y el interior celular así como el papel que los subdominios rafts de membrana plasmática y la ubiquitinación desempeñan en la internalización constitutiva y regulada del transportador, respectivamente.

Hemos descrito una regulación paracrina coordinada y antagónica de la actividad de GlyT1 y GlyT2 a través de receptores purinérgicos P2Y1. Este mecanismo produce un incremento de la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria y una reducción de la neurotransmisión glutamatérgica excitadora lo que podría conducir a anti-nocicepción.

Recientemente hemos identificado una nueva mutación dominante en el gen de GlyT2 en ocho pacientes de hiperplexia. La expresión heteróloga y caracterización de la mutación (Y705C) nos ha permitido determinar alteraciones en el tráfico y en las propiedades bioquímicas y de maduración del transportador mutante.

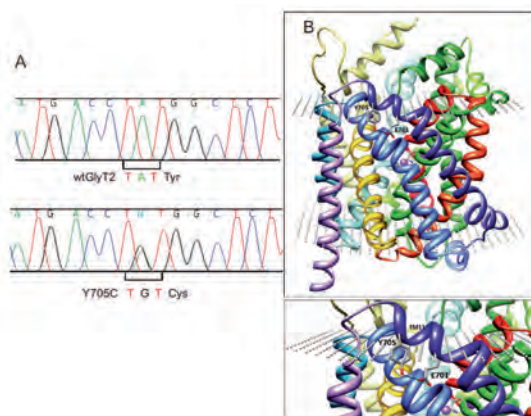


Figura 1. Análisis genético y estructural de la mutación Y705C (GlyT2) en pacientes de hiperplexia. A, Secuencias parciales del exon 15 pertenecientes a un individuo control y un paciente de hiperplexia, respectivamente. B, Modelo molecular de GlyT2 mostrando la localización de la Tyr-705 en el dominio transmembrana 11 (TM11).

Figure 1. Genetic and structural analysis of the Y705C (GlyT2) mutant in hyperekplexia patients. A, Partial sequences of exon 15 from control and patient, respectively. B, Molecular model of GlyT2 showing the localization of Tyr-705 in transmembrane domain 11 (TM11).

Research summary

Current work involves the study of functional mechanism, biogenesis, intracellular trafficking, regulation of CNS glycine transporters, GlyTs (GlyT1 and GlyT2), plasma membrane proteins of neurons and astrocytes responsible for the completion of glycinergic transmission. Gene deletion studies have suggested that modification of glycine transporter activity may be beneficial in treating several human disorders, including neuromotor deficiencies (startle disease, myoclonus), and neuropathic pain. Indeed, mutations in the gene encoding GlyT2 can cause hyperekplexia in humans and congenital muscular dystonia type 2 in calves.

Our recent studies have contributed to the identification of a site in the extracellular vestibule of GlyT2 involved in cation selectivity and glycine transport coupling mechanism by bioinformatics tools and directed mutagenesis (in collaboration with Dr. Antonio Morreale (Bioinformatic Unit, CBMSO)).

We are also interested in the study of GlyT2 trafficking as a fundamental mechanism in the control of glycinergic activity as it provides a rapid manner to modulate its activity. In this regard we have defined molecular mechanisms underlying constitutive and PKC-regulated trafficking through GlyT2 recycles between the cell surface and the cell interior and the role of membrane rafts and protein kinase C-dependent ubiquitination in the process.

In addition we have reported a coordinated regulation of GlyT1 and GlyT2 by P2Y₁R that may result in an increase of the inhibitory pathways over the excitatory pathways leading to anti-nociception.

We have recently identified a new dominant mutation in the GlyT2 gene in eight patients of hyperekplexia. The heterologous expression and characterization of the mutation (Y705C) allowed us to determine changes in trafficking and biochemical properties and maturation of the mutant transporter.

Publicaciones / Publications

Jiménez, E., Zafra, F., Pérez-Sen, R., Delicado, E.G., Miras-Portugal, M.T., Aragón, C. and López-Corcuera, B. (2011). P2Y-purinergic regulation of the glycine neurotransmitter transporters. *J. Biol. Chem.* **286**, 10712-10724.

Pérez-Siles, G., Morreale, A., Leo-Macías, A., Pita, G., Ortiz, A.R., Aragón, C., and López-Corcuera, B. (2011). Molecular basis of the differential interaction with lithium of glycine transporters GlyT1 and GlyT2. *J. Neurochem.* **118**, 195-204.

de Juan-Sanz, J., Zafra, F., López-Corcuera, B., and Aragón, C. (2011). Endocytosis of the Neuronal Glycine Transporter GlyT2: Role of Membrane Rafts and Protein Kinase C-Dependent Ubiquitination. *Traffic* **12**, 1850-1867.

Pérez-Siles, G., Núñez, E., Morreale, A., Jiménez, E., Leo-Macías, A., Pita, G., Cherubino, F., Sangaletti, R., Bossi, E., Ortiz, A.R., Aragón, C., and López-Corcuera, B. (2012). An aspartate residue in the external vestibule of GlyT2 (glycine transporter 2) controls cation access and transport coupling. *Biochem. J.* **442**, 323-334.

Werdehausen, R., Kremer, D., Brandenburger, T., Schlösser, L., Jadasz, J., Kürty, P., Bauer, I., Aragón, C., Eulenburg, V., and Hermanns, H. (2012). Lidocaine metabolites inhibit glycine transporter 1: a novel mechanism for the analgesic action of systemic lidocaine? *Anesthesiology* **116**, 147-158.

Giménez, C., Pérez-Siles, G., Martínez-Villarreal, J., Arribas-González, E., Jiménez, E., Núñez, E., de Juan-Sanz, J., Fernández-Sánchez, E., García-Tardón, N., Ibáñez, I., Romanelli, V., Nevado, J., James, V.M., Topf, M., Chung, S.K., Thomas, R.H., Desviat, L.R., Aragón, C., Zafra, F., Rees, M.I., Lapunzina, P., Harvey, R.J., and López-Corcuera, B. (2012). A novel dominant hyperekplexia mutation Y705C alters trafficking and biochemical properties of the presynaptic glycine transporter GlyT2. *J. Biol. Chem.* **287**, 28986-29002.

Premios / Awards

Carmen Aragón. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia (9 de junio de 2011).

Jaime de Juan-Sanz. Premio "Juan Abelló" (2012). Concurso científico anual de la Real Academia Nacional de Farmacia. Regulation of the glycinergic neurotransmission during inflammatory pain: A new pathway in the action of Prostaglandin E2 in the spinal cord. de Juan-Sanz, J., Núñez, E., López-Corcuera, B. and Aragón, C.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Gonzalo Pérez-Siles (2011). Relación estructura-función del transportador neuronal de glicina GlyT2. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Beatriz López-Corcuera y Carmen Aragón.

Otras actividades / Other activities

Pertenencia al Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER, grupo U751) del Instituto de Salud Carlos III desde 2007.

Pertenencia al Grupo de Investigación «Implicación de los Sistemas Glicinérgico y Glutamatérgico en Patologías del Sistema Nervioso Central» (Jefe del grupo: Cecilio Giménez) perteneciente al Instituto de Investigación Biosanitaria IdiPAZ desde noviembre 2010.

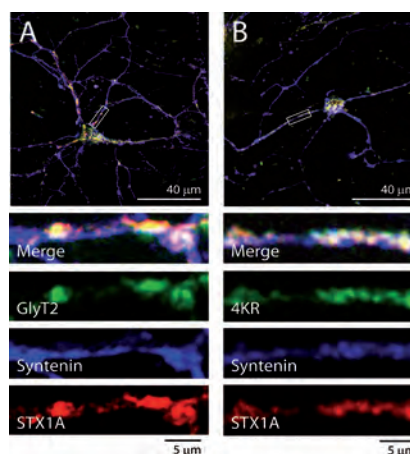


Figura 2. Colocalización de GlyT2 silvestre (A) y la mutación 4KR (sustitución de las cuatro lisinas del C-terminal por argininas) (B) con sintaxina 1A y sintenina-1. Neuronas de hipocampo de rata de 10 días en cultivo se transfectan con GlyT2 silvestre o con la mutación 4KR, se identifican con anticuerpos específicos y se analizan por microscopía confocal de fluorescencia.

Figure 2. Co-localization of GlyT2 wild type (A) and mutation of the C-terminal lysine cluster of GlyT2, 4KR (B) with syntaxin 1A and syntenin-1 in transfected hippocampal neurons. Hippocampal neurons were transfected with wild type GlyT2 or with the 4KR mutant at 10 DIV. The cultures were stained for GlyT2 syntaxin1A and syntenin-1 specific antibodies.

Función de las proteínas microtubulares en neuronas

Function of microtubular proteins in neurons



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Jesús Ávila de Grado

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Félix Hernández Pérez
Laura Sayas Casanova
María Llorens Martín
Vega García Escudero

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Almudena Fuster
Elena Gómez de Barreda Santiago
Alberto Gómez Ramos
Diana Simón

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:*

Elena Tortosa Binacua
Patricia Martín-Maestro
Jerónimo Jurado
Noemí Pallas

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance:*

Raquel Cuadros Catalán
Esther García García
Elena Langa Gabriel
Nuria de la Torre Alonso

Resumen de investigación

En nuestro grupo tenemos como objetivos el estudio de las proteínas del citoesqueleto neuronal, denominadas como proteínas asociadas a los microtúbulos o MAPs. Sobre una de ellas, MAP1B, que fundamentalmente se localiza en el axón, hemos observado que tiene también un importante papel en el desarrollo de las espinas dendríticas. Por otra parte, gran parte de nuestro trabajo se centra en la MAP conocida como proteína tau, una proteína relacionada con la enfermedad de Alzheimer y otras demencias (tauopatías). La proteína tau es un buen sustrato para la proteína quinasa GSK3, una proteína también relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Hemos publicado diferentes trabajos sobre tau y GSK3, y seguimos analizando un ratón transgénico condicional que sobreexpresa GSK3. Nuestros análisis se han centrado en el estudio de la neurogénesis, en el giro dentado, de este animal transgénico. Nuestros resultados han indicado una disminución de dicha neurogénesis que da lugar a una degeneración del giro dentado. Esta degeneración se debe a muerte celular y a la indicada disminución en neurogénesis. Estos problemas dan lugar a una pérdida de memoria en el ratón. Nuestros estudios futuros buscan conocer si los problemas de memoria descritos en enfermos de Alzheimer pudieran tener un origen en una neurogénesis deficiente en dichos pacientes.

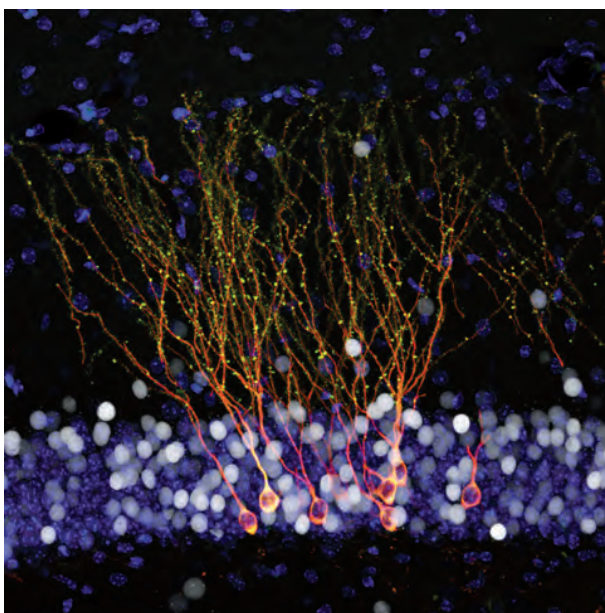


Figura 1. Neuronas granulares marcadas con un retrovirus en el giro dentado de un ratón modelo de Alzheimer.

Figure 1. Retrovirus labeled granule neurons in the dentate gyrus of Alzheimer disease mouse model.

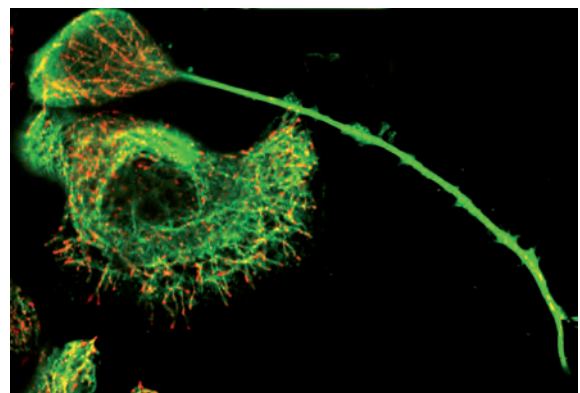


Figura 2. Células de neuroblastoma de ratón sobreexpresando tau-GFP (verde) y teñidas con un anticuerpo frente a EB1 (rojo). Aunque ambas son proteínas microtubulares, tau es una MAP clásica, que se une a lo largo de la longitud del microtúbulo, mientras que EB1 es una +TIP, que se asocia únicamente a los extremos "+" de microtúbulos en crecimiento.

Figure 2. Neuroblastoma cells overexpressing tau-GFP (green), stained with anti-EB1 (red). Although both proteins interact with microtubules, tau is a classical MAP that binds along the microtubule lattice, whereas EB1 is a +TIP that associates with microtubule "+" ends.

Research summary

During years a main objective in our group has been the characterization of the function of the cytoskeletal proteins known as microtubule associated proteins (MAPs). One of these MAPs, MAP1B, is a protein that is mainly located at the axon, in neurons. Now, we have found that MAP1B plays an important role in the development of dendritic spines. On the other hand, we are mainly focusing our studies on other MAP, tau protein. Tau protein appears to play a role in Alzheimer disease and other dementias (tauopathies). Tau protein is a suitable substrate for GSK3, a protein kinase also known as tau kinase 1 and that is also related to some features of Alzheimer disease. We have several works about tau and GSK3 and we have isolated, some years ago, a transgenic mouse that overexpresses GSK3. Now, using this mouse, we have studied the neurogenesis at the dentate gyrus. Our results have indicated a decrease in that neurogenesis, in the transgenic mouse, that results in degeneration of dentate gyrus. This degeneration is due to cell death but also to the indicated impaired neurogenesis. These features may be the cause of the memory deficits found in the transgenic mouse. Our actual studies will analyze if the memory impairment found in Alzheimer disease patients are also based in a deficient neurogenesis taking place at the dentate gyrus of the patients.

Publicaciones / Publications

- Barreda, E.G. and Ávila, J. (2011). Tau regulates the subcellular localization of calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun* **408**, 500-504.
- Blazquez-Llorca, L., García-Marín, V., Merino-Serrais, P., Ávila, J. and Defelipe, J. (2011). Abnormal Tau Phosphorylation in the Thorny Excrescences of CA3 Hippocampal Neurons in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **26**, 683-698.
- Cantero, J.L., Moreno-López, B., Portillo, F., Rubio, A., Hita-Yanez, E. and Ávila, J. (2011). Role of tau protein on neocortical and hippocampal oscillatory patterns. *Hippocampus* **21**, 827-834.
- Del Barrio, L., Martín-de-Saavedra, M.D., Romero, A., Parada, E., Egea, J., Ávila, J., McIntosh, J.M., Wonnacott, S. and López, M.G. (2011). Neurotoxicity induced by okadaic acid in the human neuroblastoma SH-SY5Y line can be differentially prevented by alpha7 and beta2* nicotinic stimulation. *Toxicol Sci* **123**, 193-205.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., de Barreda, E.G., Ávila, J. and Hernández, F. (2011). Different Susceptibility to Neurodegeneration of Dorsal and Ventral Hippocampal Dentate Gyrus: A Study with Transgenic Mice Overexpressing GSK3beta. *PLoS One* **6**, e27262.
- García-Ayllon, M.S., Small, D.H., Ávila, J. and Sáez-Valero, J. (2011). Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and beta-Amyloid. *Front Mol Neurosci* **4**, 22.
- García-Escudero, V., Gargini, R., Gallego-Hernández, M.T., García-Gómez, A., Martín-Bermejo, M.J., Simón, D., Delicado, A., Moreno-Flores, M.T., Ávila, J. and Lim, F. (2011). A neuroregenerative human ensheathing glia cell line with conditional rapid growth. *Cell Transplant* **20**, 153-166.
- Gómez-Sintes, R., Hernández, F., Lucas, J.J. and Ávila, J. (2011). GSK-3 Mouse Models to Study Neuronal Apoptosis and Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci* **4**, 45.
- Goni-Oliver, P., Ávila, J. and Hernández, F. (2011). Calpain regulates N-terminal interaction of GSK-3beta with 14-3-3zeta, p53 and PKB but not with axin. *Neurochem Int* **59**, 97-100.
- Hoglinger, G. U., et al. (2011). Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet* **43**, 699-705.
- Koechling, T., Khalique, H., Sundstrom, E., Ávila, J. and Lim, F. (2011). A culture model for neurite regeneration of human spinal cord neurons. *J Neurosci Methods* **201**, 346-354.
- Llorens-Martín, M., Hernández, F. and Ávila, J. (2011). Expression of frontotemporal dementia with parkinsonism associated to chromosome 17 TAU induces specific degeneration of the ventral dentate gyrus and depressive-like behavior in mice. *Neuroscience* **196**, 215-227.
- Llorens-Martín, M., López-Domenech, G., Soriano, E. and Ávila, J. (2011). GSK3beta Is Involved in the Relief of Mitochondria Pausing in a Tau-Dependent Manner. *PLoS One* **6**, e27686.
- Martínez, J., Lisa, S., Sanchez, R., Kowalczyk, W., Zurita, E., Teixido, M., Giralte, E., Andreu, D., Ávila, J. and Gasset, M. (2011). Selenomethionine incorporation into amyloid sequences regulates fibrillogenesis and toxicity. *PLoS One* **6**, e27999.
- Moreno, H., Choi, S., Yu, E., Brusco, J., Ávila, J., Moreira, J.E., Sugimori, M. and Llinas, R.R. (2011). Blocking Effects of Human Tau on Squid Giant Synapse Transmission and Its Prevention by T-817 MA. *Front Synaptic Neurosci* **3**, 3.
- Silveyra, M.X., García-Ayllon, M.S., de Barreda, E.G., Small, D.H., Martínez, S., Ávila, J. and Sáez-Valero, J. (2011). Altered expression of brain acetylcholinesterase in FTDP-17 human tau transgenic mice. *Neurobiol Aging* **33**, 624 e23-34.
- Simón, D., Martín-Bermejo, M. J., Gallego-Hernández, M. T., Pastrana, E., García-Escudero, V., García-Gómez, A., Lim, F., Díaz-Nido, J., Ávila, J. and Moreno-Flores, M. T. (2011). Expression of plasminogen activator inhibitor-1 by olfactory ensheathing glia promotes axonal regeneration. *Glia* **59**, 1458-1471.
- Simón, D., Medina, M., Ávila, J. and Wandosell, F. (2011). Overcoming cell death and tau phosphorylation mediated by PI3K-inhibition: a cell assay to measure neuroprotection. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **10**, 208-214.
- Sirerol-Piquer, M., Gómez-Ramos, P., Hernández, F., Pérez, M., Moran, M. A., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J. J., Ávila, J. and García-Verdugo, J. M. (2011). GSK3beta overexpression induces neuronal death and a depletion of the neurogenic niches in the dentate gyrus. *Hippocampus* **21**, 910-922.
- Tortosa, E., Montenegro-Venegas, C., Benoist, M., Hartel, S., González-Billault, C., Esteban, J.A. and Ávila, J. (2011). Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J Biol Chem* **286**, 40638.
- Ávila, J., de Barreda, E. G., Fuster-Matanzo, A., Simón, D., Llorens-Martín, M., Engel, T., Lucas, J. J., Díaz-Hernández, M. and Hernández, F. (2012). Looking for novel functions of tau. *Biochem Soc Trans* **40**, 653-655.
- Ávila, J., León-Espinosa, G., García, E., García-Escudero, V., Hernández, F. and Defelipe, J. (2012). Tau Phosphorylation by GSK3 in Different Conditions. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, 578373.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Ávila, J. and Hernández, F. (2012). Tau Protein and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Front Neurosci* **6**, 104.
- García-Escudero, V. et al. (2012). Patient-derived olfactory mucosa cells but not lung or skin fibroblasts mediate axonal regeneration of retinal ganglion neurons. *Neurosci Lett* **509**, 27-32.
- Llorens-Martín, M., Teixeira, C.M., Fuster-Matanzo, A., Jurado-Arjona, J., Borrell, V., Soriano, E., Ávila, J. and Hernández, F. (2012). Tau Isoform with Three Microtubule Binding Domains is a Marker of New Axons Generated from the Subgranular Zone in the Hippocampal Dentate Gyrus: Implications for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **29**, 921-930.
- Rubio, A., Sanchez-Mut, J.V., García, E., Velásquez, Z.D., Oliver, J., Esteller, M. and Ávila, J. (2012). Epigenetic control of somatostatin and cortistatin expression by beta amyloid peptide. *J Neurosci Res* **90**, 13-20.
- Silveyra, M.X., García-Ayllon, M.S., de Barreda, E.G., Small, D.H., Martínez, S., Ávila, J. and Sáez-Valero, J. (2012). Altered expression of brain acetylcholinesterase in FTDP-17 human tau transgenic mice. *Neurobiol Aging* **33**, 624 e23-34.
- Simón, D., García-García, E., Gómez-Ramos, A., Falcón-Pérez, J.M., Díaz-Hernández, M., Hernández, F. and Ávila, J. (2012). Tau Overexpression. Results in its Secretion via Membrane Vesicles. *Neurodegener Dis* **10**, 73-75.
- Simón, D., García-García, E., Royo, F., Falcón-Pérez, J.M. and Ávila, J. (2012). Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett* **586**, 47-54.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Elena Tortosa Binacua (2011). Estudio de la función de la proteína asociada a microtúbulos 1B durante el desarrollo neuronal. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: María del Mar Pérez, Filip Lim y Laura Sayas.

Almudena Fuster Matanzo (2011). Estudio de la neurogénesis adulta en un modelo murino de sobreexpresión condicional de la glucógeno sintasa quinasa-3β. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Félix Hernández.

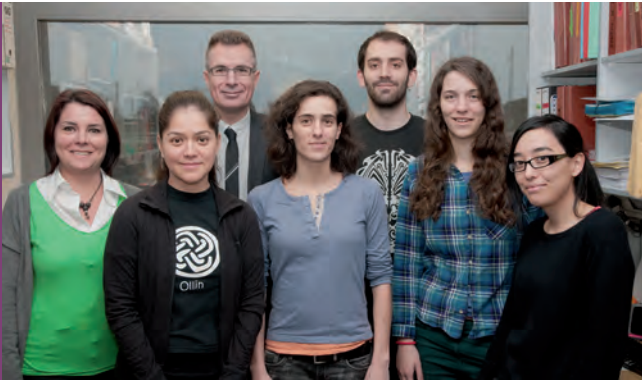
Otras actividades / Other activities

Miembro del Comité organizador del Simposio internacional en Alzheimer y Parkinson (AD/PD), Barcelona 2011.

Organización del congreso internacional en el año internacional del Alzheimer: "Global Alzheimer's Research Summit", Madrid 2011.

Fisiopatología y Terapia de las Enfermedades Neurodegenerativas: Ataxia de Friedreich

Physiopathology and Therapy of Neurodegenerative Diseases: Friedreich's Ataxia



Jefe de Línea / Group Leader:
Javier Díaz Nido

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Gloria María Palomo Carrasco
Sara Pérez Luz
Frida Loria Salinas

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Yurika María Katsu Jiménez
Daniel Oberdoerfer
Jara Moreno Lorite

Resumen de investigación

Nuestro grupo investiga, en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, los procesos de disfunción y muerte de las neuronas para encontrar vías de estimulación de la supervivencia y reparación neuronales, con vistas a su posible aplicación terapéutica. En particular, nos hemos enfocado en la ataxia de Friedreich, enfermedad neurogenética causada por un déficit de frataxina, una proteína mitocondrial codificada en el genoma nuclear. La ataxia de Friedreich es una enfermedad principalmente (aunque no exclusivamente) neurodegenerativa, de un inicio muy precoz, y puede servir como un modelo muy útil para otras enfermedades neurodegenerativas en las que la disfunción mitocondrial también juega un papel muy importante.

En este contexto, hemos desarrollado distintos modelos celulares neurales para estudiar los mecanismos moleculares del proceso degenerativo disparado por la deficiencia de frataxina. Para ello hemos empleado cultivos primarios de neuronas de ratón y líneas celulares establecidas de neuroblastoma humano, así como cultivos de células troncales procedentes de biopsias de mucosa olfativa de donantes humanos.

Estos estudios pueden llevar a la identificación de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores tanto para la ataxia de Friedreich como para otras enfermedades neurológicas que cursan con disfunción mitocondrial. Además, estos modelos celulares se están empleando para ensayar posibles estrategias terapéuticas con un énfasis en encontrar moléculas (fármacos o genes) capaces de compensar los déficits funcionales inducidos por la deficiencia de frataxina o bien capaces de incrementar la expresión de la frataxina de una manera eficiente.

Nuestro grupo también ha considerado una aproximación de terapia génica para la ataxia de Friedreich introduciendo copias correctas del gen de la frataxina mediante la administración de vectores herpesvirales portadores del cDNA o del "locus" genómico completo de la frataxina. Ahora pretendemos optimizar las vías de aplicación y distribución de distintos vectores virales y no-virales en el sistema espinocerebelar. Además, también estamos investigando la aplicación de vectores portadores de otros genes neuroprotectores.

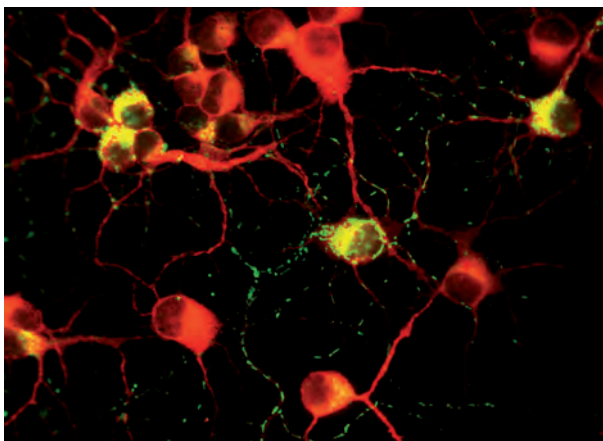


Figura 1. Localización mitocondrial de la frataxina expresada en neuronas granulares de cerebelo mediante un vector lentiviral.

Figure 1. Mitochondrial localization of overexpressed frataxin in cultured cerebellar granule neurons transduced with a lentiviral vector.

Research summary

Our group studies the dysfunction and death of neurons in the context of neurodegenerative diseases in order to find ways to stimulate neuronal survival and repair, with a view to possible therapeutic applications. Within the wide spectrum of neurodegenerative diseases, we have focused on Friedreich's ataxia (FA), FA is a hereditary disorder resulting from a deficiency of frataxin, which is a mitochondrial protein encoded for by the nuclear genome. FA is mainly (but not exclusively) a neurodegenerative disease with a very early onset, and it may serve as a very useful model for other neurodegenerative diseases in which mitochondrial dysfunction also plays a very important role.

We have developed distinct neural cell models to study the molecular mechanisms underlying the degenerative process triggered by the frataxin deficiency. In this respect we have used primary cultures of mouse neurons and human neuroblastoma cell lines, as well as cultured olfactory mucosa stem cells derived from biopsies from human donors. These studies may facilitate the identification of novel therapeutic targets and biomarkers not only for FA but also for other neurological diseases characterized by a prominent mitochondrial dysfunction. These cell models are also being used to test potential therapeutic strategies, particularly those focused on identifying molecules (drugs or genes) capable of compensating for the functional defects induced by the loss of frataxin, or that are capable of efficiently increasing the expression of frataxin.

Our group has also considered a gene therapy approach for Friedreich's ataxia that involves introducing correct copies of the frataxin gene by administering herpes virus vectors carrying the frataxin cDNA or the entire genomic frataxin "locus". We are now attempting to optimize the route of administration and the delivery and distribution of both viral and non-viral vectors in the spinocerebellar system. Furthermore, we are also investigating the possible application of vectors that may carry other neuroprotective genes.

Publicaciones / Publications

Giménez-Cassina, A., Lim, F., and Díaz-Nido, J. (2012) Chronic inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects against rotenone-induced cell death in human neuron-like cells by increasing BDNF secretion. *Neurosci Lett*. **531**, 182-187.

Klionsky, D.J., et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. **8**, 445-544.

Simón, D., Martín-Bermejo, M.J., Gallego-Hernández, M.T., Pastrana, E., García-Escudero, V., García-Gómez, A., Lim, F., Díaz-Nido, J., Ávila, J., and Moreno-Flores, M.T. (2011) Expression of plasminogen activator inhibitor-1 by olfactory ensheathing glia promotes axonal regeneration. *Glia*. **59**, 1458-1471.

Palomo, G.M., Cerrato, T., Gargini, R., and Díaz-Nido, J. (2011) Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. *Hum Mol Genet*. **20**, 2807-2822.

Giménez-Cassina, A., Wade-Martins, R., Gomez-Sebastian, S., Corona, J.C., Lim, F., and Díaz-Nido, J. (2011) Infectious delivery and long-term persistence of transgene expression in the brain by a 135-kb iBAC-FXN genomic DNA expression vector. *Gene Ther*. **18**, 1015-1019.

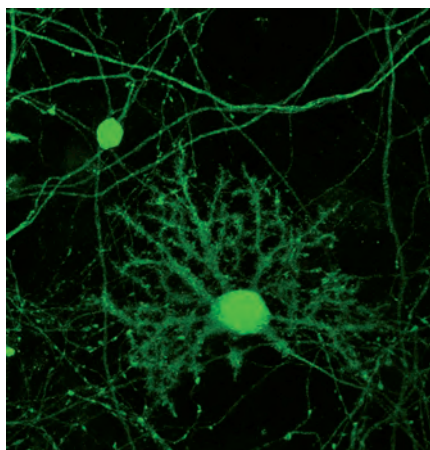


Figura 2. Neurona de Purkinje de cerebelo de ratón en cultivo primario.

Figure 2. Cultured Purkinje neuron from mouse cerebellum

Otras actividades / Other activities

Nuestro Grupo de Investigación también forma parte (como unidad 748) del Área de Medicina Genética del Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Raras (CIBERER), auspiciado por el Instituto de Salud Carlos III.

Más información en la página web: <http://www.ciberer.es/>

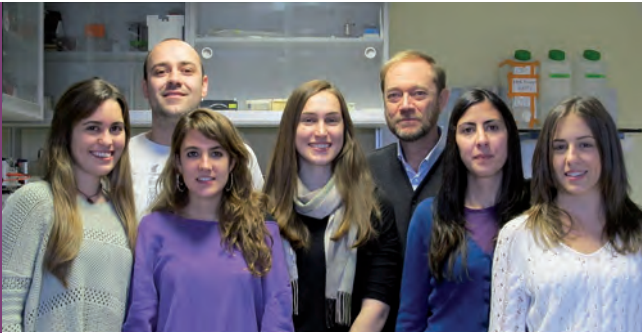
Además de nuestra actividad investigadora, estamos fuertemente comprometidos con la mejora e innovación de la enseñanza/aprendizaje de la Biomedicina, así como en la difusión social de los avances de la investigación biomédica. Javier Díaz-Nido desarrolla labores docentes en la Universidad Autónoma de Madrid, donde coordina el Programa de Postgrado en Biociencias Moleculares.

Más información sobre Postgrado en la página web: <http://biociencias.bq.uam.es/index.php>

Our Research Group also belongs, as Unit 748, to the Genetic Medicine Program of the Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), a network structure set up at the initiative of the "Instituto de Salud Carlos III". More information at the web page: <http://www.ciberer.es/index.php?lang=english>

In addition to our research activity, we are strongly committed with the improvement and innovation of learning/teaching in Biomedicine as well as in outreach and communication activities of advances in biomedical research. Javier Díaz-Nido is currently the Coordinator of the Postgraduate Program in Molecular Biosciences at the "Universidad Autónoma de Madrid". More information on Graduate Studies at the web page: <http://biociencias.bq.uam.es/en/index.php>

Bases Moleculares de la Plasticidad Neuronal

Molecular Bases of Neuronal Plasticity

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Fco. Javier Díez Guerra

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Patricia Soriano Durán
Amanda Jiménez Pompa
Kate Pischke

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Alberto Garrido García
Silvia Sánchez Agüera

Estudiantes / *Undergraduate Students:*

Ana Keating
M^a Teresa Villalba Villacorta
Celia Martínez Pérez
Lucía Morales Muñoz

Resumen de investigación

Nuestra investigación está dirigida a comprender los mecanismos celulares y moleculares que operan en las redes neuronales para modular su eficacia sináptica. Nuestro objetivo actual es desvelar los mecanismos que utilizan las proteínas de unión a calcio para regular la plasticidad neuronal. La actividad sináptica desencadena oscilaciones intracelulares de calcio que inician un número de vías de señalización, muchas de ellas reguladas por la proteína Calmodulina (CaM). A pesar de su abundancia, la disponibilidad de CaM frente sus efectores está regulada por la presencia de proteínas como neurogranina (Ng), que secuestra CaM en el entorno post-sináptico. Ng es una proteína neuronal abundante cuya capacidad de acumular CaM está regulada por la concentración de calcio y por fosforilación por proteína quinasa C. Proponemos que Ng ejerce una doble función: por un lado, previene la activación de efectores de CaM en respuesta a estímulos de baja intensidad y, por otro, selecciona y favorece la activación de vías de señalización dependientes de CaM. Actualmente, estamos estudiando la regulación de la traducción de Ng en dendritas y su localización intracelular. Recientemente, hemos demostrado que Ng se transloca al núcleo en respuesta a actividad sináptica y que Ng se une específicamente a ácido fosfatídico (PA), un fosfolípido que actúa como molécula señalizadora. Utilizamos cultivos de neuronas disociadas obtenidas a partir de corteza cerebral e hipocampo, junto con técnicas de biología celular, bioquímica, biología molecular y microscopía avanzada. La falta de Ng está estrechamente vinculada a trastornos cognitivos, alteraciones presentes en gran cantidad de enfermedades neurológicas, como el hipotiroidismo o la esquizofrenia. Estamos convencidos de que Ng es una excelente diana molecular para el diseño y desarrollo de fármacos y terapias dirigidas a mejorar las habilidades cognitivas. Un mayor conocimiento de los mecanismos en los que intervienen las proteínas secuestradoras de CaM, promoverá la aparición de nuevos fármacos y terapias orientadas a mejorar la calidad de vida de las personas mayores y los pacientes afectados de enfermedades neurológicas.

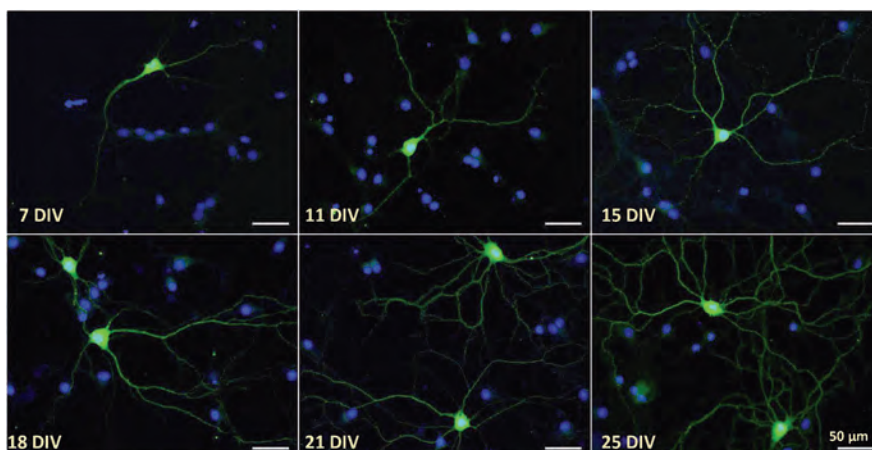


Figura 1. Neuronas de hipocampo en cultivo en varios estadios de desarrollo (DIV = días in cultivo). En azul se muestra la tinción de DAPI (núcleos) y en verde, la expresión de Neurogranina (Ng) en algunas de las neuronas.

Figure 1. Cultured hippocampal neurons at various stages of development (DIV = days in vitro). Highlighted in blue is the DAPI stain (nuclei) and in green, the expression of Neurogranin (Ng) in some neurons.

Research summary

One of the most important and fascinating properties of the brain is its plasticity; in other words, the capacity of the neural activity generated by experience to alter the function of neural circuits and thereby modify subsequent thoughts, feelings and behavior. Our group studies the molecular mechanisms that operate in neural networks and modulate the efficiency of their synaptic contacts. A central objective is to reveal how calcium-binding proteins cooperate in the synaptic environment to regulate these mechanisms. Neural activity generates calcium oscillations that activate intracellular signaling pathways, mostly transduced by the protein calmodulin (CaM). Despite its abundance, the availability of CaM to initiate the activation of signaling pathways is limited by the presence of proteins such as GAP-43 and neurogranin (Ng), which sequester and locally accumulate CaM at low calcium concentrations. Both are abundant proteins located on the presynaptic and postsynaptic elements, respectively, and whose ability to sequester CaM depends on its phosphorylation by protein kinase C. Our working hypothesis suggests that GAP-43 and Ng modulate the synaptic response in two ways: first, by suppressing the “noise” arising from the subthreshold activation of CaM effectors and, secondly, by promoting the downstream activation of some signaling pathways over others. Our research focuses on the expression and degradation of GAP-43 and Ng, their intracellular location, their modifications and interactions in several paradigms of neural plasticity. Ng deficiency is associated with cognitive deficits which are typical of several diseases, such as hypothyroidism or, more recently, schizophrenia. We are convinced that Ng is an excellent target for the development of drugs and strategies designed to improve the cognitive function. We hope that a better knowledge of the participation of Ng and GAP-43 in the mechanisms of plasticity contributes to alleviate the cognitive deficits associated with aging and neurodegenerative diseases.

Publicaciones / Publications

Sánchez, C., Muñoz, M.A., Villalba, M., Labrador, V., and Díez-Guerra, F.J. (2011) Setting Up and Running an Advanced Light Microscopy and Imaging Facility. *Current Protocols in Cytometry* **57**.

Quintas, A., de Solís, A.J., Díez-Guerra, F.J., Carrascosa, J.M. and Bógonéz, E. (2012) Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus: Prevention by late-onset caloric restriction. *Experimental Gerontology*, **47**(2):198-201.

F. Javier Díez-Guerra y C. Sánchez. (2012) Técnicas Avanzadas de Microscopía Óptica para el Estudio de la Fisiopatología Celular”. En “Nefrología Clínica”, 4ª Edición, Sección 2ª, Capítulo 5. Editorial Panamericana, Madrid.

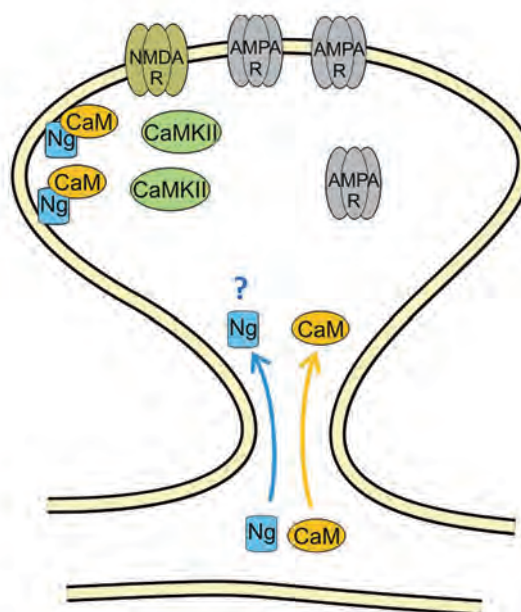


Figura 2. La fuerza sináptica es modulada por calmodulina (CaM) en el interior de las espinas dendríticas. La movilización de CaM a su vez depende de la translocación de Neurogranina (Ng) desde el tallo de la dendrita.

Figure 2. Synaptic strength is modulated by Calmodulin (CaM) within dendritic spines. The mobilization of CaM depends on the translocation of Neurogranin (Ng) from the dendritic shaft.

Disfunción Neuronal durante el envejecimiento

Neuronal Dysfunction during aging

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Carlos Dotti

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Isabela Alonso

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Mauricio Martín
Stefano Benvegna
Anna Brachet

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:*
Enrique Gabandé
Ernest Palomer
Adrián Martín

Técnico de Investigación / *Technical Assistance:*
Irene Palomares

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
Inés Mateo
Isabel Salas

Resumen de investigación

La línea de trabajo de nuestro laboratorio está orientada a descubrir las rutas de señalización y los mecanismos implicados en la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica durante el envejecimiento cerebral. Conforme el individuo envejece ocurren cambios graduales pero persistentes en el colesterol y la esfingomielina de la membrana plasmática de las neuronas del hipocampo, un área del cerebro muy implicada en la memoria y el aprendizaje. Funcionalmente, estos cambios en el contenido de colesterol/esfingomielina conducen a un aumento en la cantidad de receptores tirosina quinasa en la membrana plasmática de las neuronas viejas, especialmente del receptor TrkB. Hemos visto que este evento refuerza la respuesta de supervivencia a estrés en neuronas viejas expuestas a agentes tóxicos externos. De manera negativa, los cambios en colesterol/esfingomielina relacionados con el envejecimiento neuronal afectan a la movilidad lateral y a la internalización de los receptores de glutamato tipo AMPA, reduciendo la capacidad y eficiencia de las neuronas viejas para llevar a cabo ciertas formas de respuesta eléctrica implicadas en el aprendizaje. A nivel molecular, los cambios que ocurren en el balance de estos lípidos con la edad, producen la difusión de la molécula MARCKS de unión a PI(4,5)P₂, alejándolos de las zonas de sinapsis. Esta pérdida repercute en la cantidad de PI(4,5)P₂ que es hidrolizada por PLC γ y por tanto se reduce la activación de genes implicados en la memoria.

Los principales objetivos del laboratorio para los próximos años son: i) profundizar en nuestro conocimiento de los mecanismos relacionados con la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica en relación con el envejecimiento neuronal, ii) identificar las rutas de señalización que podrían mejorar la cognición en neuronas viejas al tiempo que mantener intactos los robustos mecanismos de supervivencia y iii) identificar las causas de las patologías del cerebro envejecido.

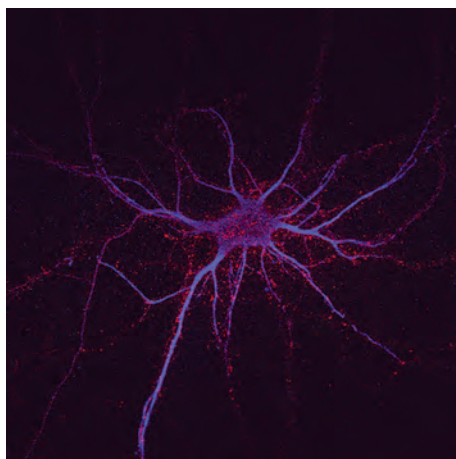


Figura 1. Marcador dendrítico y receptores en neurona hipocampal.

Figure 1. Dendritic marker and receptors in hippocampal neuron.

Research summary

Our laboratory aims at elucidating the pathways and mechanisms involved in neuronal survival and plasticity in the aged brain. As the individual ages, it occurs a gradual but persistent change in the cholesterol and sphingomyelin content in the plasma membrane of hippocampal neurons, an area of the brain strongly implicated in learning and memory. These changes seem to be due to the transcriptional up-regulation of the genes sphingomyelin synthase and 24 cholesterol hydroxylase, in turn the consequence of metabolic stress from excitatory neurotransmission, therefore a physiological response to normal brain activity. Functionally, the cholesterol/sphingomyelin content changes increase the clustering of receptor tyrosine kinase in the plasma membrane of the aging neurons, especially TrkB, helping the survival response of old neurons to exogenous stressors. On the negative side, cholesterol/sphingomyelin content alterations with age result in impaired lateral mobility and internalization of glutamate receptors of the AMPA type, reducing the capacity of old neurons to efficiently support certain forms of electrical response involved in learning. In molecular terms, the lipid imbalance occurring with age leads to the diffusion away from synaptic sites of the cholesterol and PI(4,5)P2 binding molecule MARCKS. Such loss impacts on the amount of PI(4,5)P2 to be hydrolyzed by PLC γ and therefore the reduced activation of memory genes.

My laboratory has three major goals for the next years: i) to deepen our understanding of the survival and plasticity mechanisms operating in the aging brain, ii) to identify pathways that could improve cognition in the old without interfering with survival strength and iii) to identify the causes of pathological brain aging.

Publicaciones / Publications

Martin, M.G., Trovo, L., Perga, S., Sadowska, A., Rasola, A., Chiara, F. and Dotti, C.G. (2011) Cyp46-mediated cholesterol loss promotes survival in stressed hippocampal neurons. *Neurobiol. Aging* **32**(5):933-943.

Iannilli, F., Sodero, A.O., Ledesma, M.D. and Dotti, C.G. (2011) Oxidative stress activates the pro-survival TrkA pathway through membrane cholesterol loss. *Neurobiol. Aging* **32**(6):1033-1042.

Sodero, A.O., Weissmann, C., Ledesma, M.D. and Dotti, C.G. (2011) Metabolic stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons in vitro. *Neurobiol. Aging* **32**(6):1043-1053.

Pollarolo, G., Munck, S., Schulz, J. and Dotti, C.G. (2011) Cytokinesis remnants define first neuronal asymmetry in vivo. *Nature Neurosci.* **14**(12):1525-1533.

Trovò, L., Martín, M.G., Van Veldhoven, P. and Dotti, C.G. (2011) Sphingomyelin up-regulation in mature neurons contributes to TrkB activity by Rac1 macroendocytosis. *J. Cell Sci.* **124**, 1308-1315.

Menchon, S., Gaertner, A., Roman, P. and Dotti, C.G. (2011) Neuronal (bi) polarity as a self-organized process enhanced by growing membrane. *PLoS One* **6**, 24190.

Michaki, V., Guix, F.X., Vennekens, K., Munck, S., Dingwall, C., Davis, J.B., Townsend, D.M., Tew, K.D., Feiguin, F., De Strooper, B., Dotti, C.G*, and Wahle, T. (2012) Down-regulation of the ATP-binding Casette Transporter 2 (Abca2) reduces Amyloid- β -Production by Altering Nicastrin Maturation and Intracellular localization. *J Biol Chem.* **287**(2):1100-1111. * corresponding author.

Nesic, I., Guix, F.X., Vennekens, K., Michaki, V., Van Veldhoven, P.P., Feiguin, F., De Strooper, B., Dotti, C.G*, and Wahle, T. (2012) Alterations in phosphatidylethanolamine levels affect the generation of A β . *Aging Cell* **11**(1):63-72. * corresponding author.

Sodero, A., Vriens, J., Ghosh, D., Stegner, D., Brachet, A., Pallotto, M., Sassoe-Pognetto, M., Browers, J.F., Helms, J.B., Nieswandt, B., Voets, T. and Dotti, C.G. (2012) Cholesterol loss during glutamate-mediated excitotoxicity. *EMBO J.* **31**(7):1764-1773.

Gaertner, A., Fornasiero, E.F., Munck, S., Vennekens, K., Seuntjens, E., Huttner, W.B., Valtorta, F. and Dotti, C.G. (2012) N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. *EMBO J.* **31**(8):1893-1903.

Menchon, S.A., Martín, M.G. and Dotti, C.G. (2012) APM_GUI: analyzing particle movement on the cell membrane and determining confinement. *BMC Biophys.* **5**:4.

Guix, F., Wahle, T., Vennekens, K., Senllinx, A., Chavez-Gutierrez, L., Ill-Raga, F., Ramos, E., Guardia-Laguarta, C., Lleó, A., Arimon, M., Berezovska, O., Muñoz, F.J., Dotti, C.G*, and De Strooper, B. (2012) Modification of g-secretase by nitrosative stress links neuronal aging to sporadic Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* **4**(7):660-673.

* corresponding author.

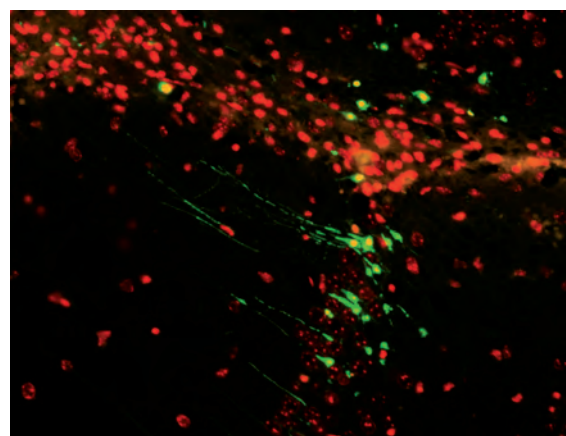


Figura 2. Expresión de proteínas exógenas en neuronas de corteza cerebral.

Figure 2. Recombinant protein expression in cerebral cortex.

Mecanismos moleculares y celulares de la plasticidad sináptica

Molecular and cellular mechanisms for synaptic plasticity

Jefe de Línea / *Group Leader*:
José Antonio Esteban García

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*:
Shira Knafo
Marion Benoist
Mónica Fernández Monreal
Anna Brachet

Becarios Predoctorales / *Graduate Students*:
María Royo Cantabrana
Argentina Lario Lago

Rocío Palenzuela Muñoz
Cristina Sánchez-Puelles
Peñaranda
Jonathan Evan Draffin

Técnico de Investigación / *Technical Assistance*:
María Muñoz Palencia

Estudiantes / *Undergraduate Students*:
Vladimir Shlevkov
Stephanie Norwood

Resumen de investigación

Nuestro laboratorio está interesado en las bases moleculares del aprendizaje y la memoria. Específicamente, investigamos cómo las conexiones sinápticas en el cerebro son modificadas durante la experiencia. Este proceso, conocido como plasticidad sináptica, es fundamental para el aprendizaje y la memoria. Además, se ha observado que múltiples enfermedades mentales, como el Alzheimer y varias formas de retraso mental, están asociadas a alteraciones en plasticidad sináptica.

Durante los últimos años, hemos descubierto que las neuronas pueden modificar sus sinapsis insertando o eliminando receptores de neurotransmisor en la membrana sináptica. Nuestro grupo ha sido pionero en la identificación de múltiples componentes de la maquinaria molecular que ejecuta este transporte, como son los compartimentos endosomales controlados por Rab GTPasas, motores moleculares, y reguladores de la señalización por fosfoinosítidos. Para ello, el laboratorio utiliza una combinación de técnicas de biología molecular, microscopía de fluorescencia y electrofisiología.

Recientemente, nos hemos concentrado en cómo estos mecanismos controlan la función cognitiva, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Así, hemos descrito estrategias moleculares y farmacológicas que facilitan el transporte de receptores de neurotransmisor en las sinapsis, y que resultan en una mejora del aprendizaje y la memoria en ratas. Y a la inversa, hemos avanzado considerablemente en el conocimiento de los mecanismos moleculares que producen un funcionamiento defectuoso de las sinapsis, y que conducen a situaciones patológicas como la enfermedad de Alzheimer. De hecho, resultados preliminares del laboratorio nos dan pistas de cómo corregir estas deficiencias y restablecer las funciones cognitivas normales en modelos de ratón de esta enfermedad.

En general, nuestro laboratorio continúa explorando cómo moléculas individuales y rutas de señalización controlan la función sináptica y determinan nuestra capacidad cognitiva, en la salud y en la enfermedad.

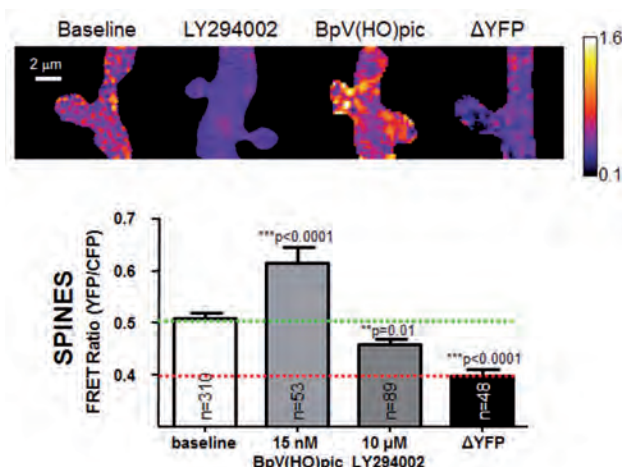


Figura 1. Ensayo de FRET (*Fluorescente Resonante Energy Transfer*) para la visualización de PIP3 en espinas dendríticas. La expresión del indicador de FRET *Flip-pm* (Sato et al., *Nat Cell Biol* 2003) en neuronas de hipocampo nos permite la cuantificación de los niveles de PIP3 a partir de la relación de fluorescencia YFP/CFP después de diferentes manipulaciones farmacológicas (Arriba: representación en "falso color" de espinas dendríticas. Abajo: representación gráfica en histograma).

Figure 1. Fluorescence Resonance Energy Transfer assay for the visualization of PIP3 at dendritic spines. Expression of the FRET reporter *Flip-pm* (Sato et al., *Nat Cell Biol* 2003) in hippocampal neurons allows the quantification of PIP3 levels from YFP/CFP fluorescence ratios upon different pharmacological manipulations (Top: false color representation at dendritic spines. Bottom: histogram representation).

Research summary

We are interested in the molecular bases for learning and memory. Specifically, we investigate how synaptic connections in the brain are modified in response to experience. This process, known as synaptic plasticity, is critical for learning and memory, and is known to be altered in multiple cognitive disorders, such as Alzheimer's disease, autism and several forms of mental retardation.

Over the years, we have discovered that neurons fine-tune their synapses by moving neurotransmitter receptors in and out of the synaptic membrane. Our group has pioneered the identification of the molecular machinery that executes this movement, including a network of endosomal compartments driven by specific Rab GTPases, molecular motors, and regulators of phosphoinositide signaling. For these experiments, the laboratory employs a combination of molecular biology techniques, together with live fluorescence microscopy and electrophysiology.

In recent years, we have become more interested in how these mechanisms control cognitive function, both under physiological and pathological conditions. Thus, we have described molecular and pharmacological strategies that facilitate neurotransmitter receptor trafficking at synapses, resulting in enhanced learning and memory in rats. Conversely, we have made significant progress in understanding the molecular mechanisms that lead to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. Indeed, preliminary results from the laboratory provide clues as to how to correct these dysfunctions and restore normal cognitive function in mouse animal models of this disease.

Overall, our laboratory continues to explore how individual molecules and signaling pathways control synaptic function and determine our cognitive abilities in health and disease.

Publicaciones / Publications

Tortosa, E., Montenegro-Venegas, C., Benoist, M., Härtel, S., González-Billault, C., Esteban, J. A. and Ávila, J. (2011) Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J. Biol. Chem.* **286**, 40638-40648.

Franco, A., Knafo, S., Banon-Rodríguez, I., Merino-Serrais, P., Fernaud-Espinosa, I., Nieto, M., Garrido, J. J., Esteban, J. A., Wandosell, F. and Anton, I. M. (2012) WIP Is a Negative Regulator of Neuronal Maturation and Synaptic Activity. *Cereb. Cortex.* **22**, 1191-1202.

Knafo, S., Venero, C., Sánchez-Puelles, C., Pereda-Pérez, I., Franco, A., Sandi, C., Suárez, L.M., Solís, J.M., Alonso-Nanclares, L., Martín, E.D., Merino-Serrais, P., Borcel, E., Li, S., Chen, Y., Gonzalez-Soriano, J., Berezin, V., Bock, E., DeFelipe, J. and Esteban, J.A. (2012) Facilitation of AMPA receptor synaptic delivery as a molecular mechanism for cognitive enhancement. *PLoS Biology* **10**, doi:10.1371/journal.pbio.1001262.

Knafo, S. and Esteban, J. A. (2012) Common Pathways for Growth and for Plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 405-412.

Fernández-Monreal, M., Brown, T.C., Rojo, M. and Esteban, J.A. (2012) The balance between receptor recycling and trafficking towards lysosomes determines synaptic strength during long-term depression. *J. Neurosci.* **32**, 13200-13205.

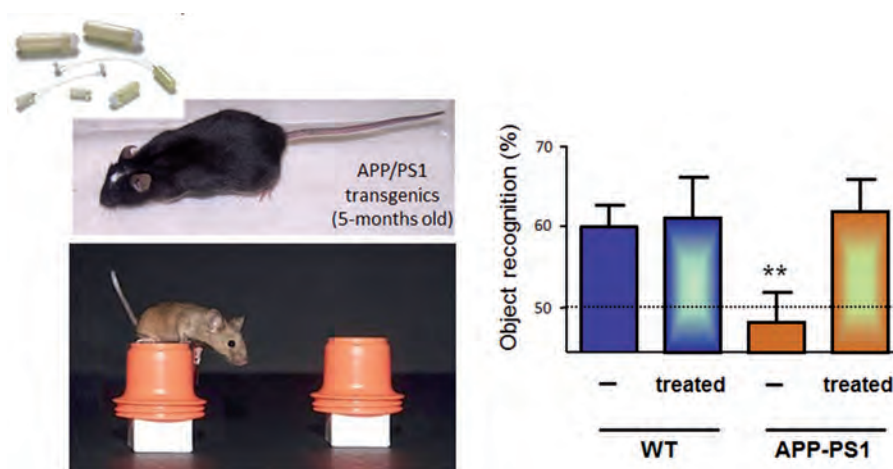


Figura 2. Ejemplo de un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer (APP/PS1) tratado farmacológicamente con "mini-bombas osmóticas" y canulación intracerebro ventricular (panel izquierdo, arriba). Sobre estos animales se realizó un test de memoria espacial ("nueva localización de objetos"; panel izquierdo, abajo). El resultado indica que un tratamiento específico puede restaurar la función cognitiva en estos animales (cuantificación en panel derecho).

Figure 2. Example of a mouse model of Alzheimer's disease (APP/PS1) pharmacologically treated using mini-osmotic pumps and intracerebro ventricular cannulation (left panel, top). A behavioral test for spatial memory (novel object location; left panel, bottom) was carried out on these animals. The results indicate that a specific treatment may rescue cognitive function in these animals (quantification shown in right panel).

Bases moleculares de las sinapsis glutamatergicas

Molecular bases of glutamatergic synapses



Jefes de Línea / Group Leaders:

Cecilio Giménez Martín
Francisco Zafra

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:

Esperanza Jiménez

Becarios Predoctorales / Graduate Students:

Ignacio Ibáñez
Cristiana Leite

Técnico de Investigación / Technical Assistance:

Enrique Núñez

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Valentina González
Rocío Merino

Científicos Visitantes / Visitor Scientists:

Angelina Rodríguez
(Univ. Autónoma de Querétaro, Mexico)

Resumen de investigación

Durante años, el interés principal de nuestro laboratorio ha sido la comprensión de los mecanismos básicos de regulación de los transportadores de glutamato y glicina en el SNC, y cómo la desregulación de estas proteínas, o sus proteínas reguladoras asociadas, pueden contribuir a los trastornos neurológicos como la esquizofrenia, la esclerosis lateral amiotrófica, o lesiones isquémicas en el cerebro. El papel de los neurotransportadores para el glutamato (GLT1, GLAST, EAAT3) y glicina (GLYT1) es controlar los niveles de estos neurotransmisores en las sinapsis glutamatergicas regulando de esta manera la actividad de los receptores NMDA que requiere la unión de ambos ligandos como coagonists obligatorios. Mientras que la sobreestimulación de estos receptores conduce procesos neurodegenerativos, la hipofunción se ha asociado a la esquizofrenia.

Nuestro trabajo se ha centrado en una mejor comprensión de los mecanismos de biogénesis: salida desde el retículo endoplásmico, el tránsito a través del aparato de Golgi, y la distribución asimétrica de subdominios diferentes de la membrana plasmática, su anclaje a proteínas de andamiaje y, finalmente, la endocitosis, ya sea para degradación o reciclaje. Nuestros estudios han contribuido a la localización fina de estas proteínas en el cerebro, así como a la identificación de varias proteínas asociadas (proteínas PDZ, exocitosis) y la localización e identificación de los motivos estructurales que participan en la distribución asimétrica de estos transportadores en células polarizadas. Asimismo, hemos definido los mecanismos de regulación basados en modificaciones posttranscripcionales sobre los transportadores tales como la fosforilación y ubiquitinación / deubiquitinación. Por otra parte, mantenemos interés en la función de la glicina como un neurotransmisor inhibitorio y el GLYT2, transportador asociado, que participan en la enfermedad genética hiperekplexia. Estos estudios, en especial los relacionados con el tráfico de GLYT2, se han realizado en los últimos años en colaboración con el grupo de la Dra. C. Aragón.

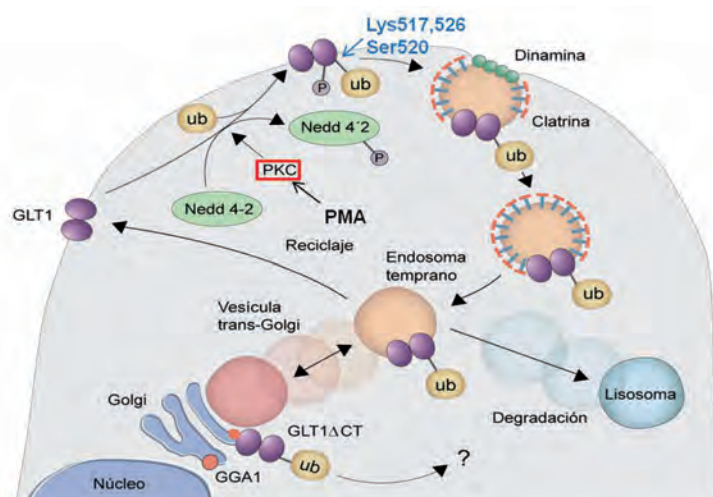


Figura 1. Esquema del tráfico intracelular constitutivo y regulado del transportador de glutamato GLT1.

Figure 1. Constitutive and regulated intracellular trafficking of the glutamate transporter GLT1.

Research summary

For years, a primary focus of our laboratory has been the understanding the basic regulatory mechanisms of glial and neuronal glutamate and glycine transporters in CNS, and how dysregulation of these proteins, or their associated regulatory proteins, could contribute to neurological disorders such as schizophrenia, amyotrophic lateral sclerosis, or ischemic insults to the brain. Neurotransporters for glutamate (GLT1, GLAST, EAAT3) and glycine (GLYT1) control the levels of these neurotransmitters in glutamatergic synapses thereby regulating the activity of NMDA receptors that requires both ligands as obligatory coagonists. While overstimulation of these receptors drives neurodegenerative processes, the hypofunction has been associated to schizophrenia. Thus, the activity of these transporters has a profound impact on the activity of the glutamatergic pathways, and its modulation is considered of great interest in the treatment of dysfunctions that affect to the glutamatergic system. Our work has intended a better understanding the biogenesis mechanisms: exit from the endoplasmic reticulum, transit through the Golgi complex, and asymmetric distribution to different subdomains of the plasma membrane, its anchoring to scaffolding proteins and, finally, the endocytosis either for degradation or recycling.

Our studies have contributed to the fine localization of these proteins in the brain as well as to the identification of several associated proteins (PDZ proteins, exocyst) and to the identification of structural motifs involved in the asymmetric distribution of these transporters in polarized cells. Also, we have defined regulatory mechanisms based in posttranscriptional modifications on the transporters such as phosphorylation and ubiquitination / deubiquitination. In addition, we keep interest in the function of glycine as an inhibitory neurotransmitter, and the associated transporter GLYT2, involved in the genetic disease hyperekplexia. These studies, especially those related with trafficking of GLYT2, have been performed in the last few years in collaboration with the group of Dr. C. Aragón.

Publicaciones / Publications

Jiménez, E., Zafra, F., Pérez-Sen, R., García-Delgado, E., Miras-Portugal, MT., Aragón C. and López-Corcuera, B. (2011) P2Y Purinergic receptor regulation of the glycine neurotransmitter transporters. *J. Biol. Chem.* **286**, 10712-10724.

Rodríguez, A., Berumen, L.C., Zafra, F., Giménez, C. and García-Alcocer, MG (2011). Expression of the SNAT2 amino acid transporter during the development of rat cerebral cortex. *Int. J. Dev. Neurosci.* **29**, 743-748.

de Juan-Sanz, J., Zafra, F., López-Corcuera, B. and Aragón, C. (2011) Endocytosis of the neuronal glycine transporter GLYT2: role of membrane rafts and protein kinase C-dependent ubiquitination. *Traffic*. **12**, 1850-1867.

García-Tardón, N., González-González, I.M., Martínez-Villarreal, J., Fernández-Sánchez, E., Giménez, C. and Zafra, F. (2012) PKC-promoted endocytosis of the glutamate transporter GLT-1 requires Nedd4-2-dependent ubiquitination but not phosphorylation. *J. Biol Chem.* **287**, 19177-19187.

Martínez-Villarreal, J., García-Tardón, N., Ibáñez, I., Giménez, C., Zafra, F. (2012) Cell surface turnover of the glutamate transporter GLT-1 is mediated by ubiquitination/ deubiquitination. *GLIA* **60**, 1356-1365.

Giménez, C., Pérez-Siles, G., Martínez-Villarreal, J., Arribas-González, E., Jiménez, E., Núñez, E., de Juan-Sanz, J., Fernández-Sánchez, E., García-Tardón, N., Ibáñez, I., Romanelli, V., Nevado, J., James, V.M., Topf, M., Chung, S.K., Thomas, R.H., Desviat, L.R., Aragón, C., Zafra, F., Rees, M.I., Lapunzina, P., Harvey, R.J., López-Corcuera, B. (2012) A novel dominant hyperekplexia mutation Y705C alters trafficking and biochemical properties of the presynaptic glycine transporter GlyT2. *J. Biol. Chem.* **287**, 28986-29002.

Premios / Awards

Cecilio Giménez: Miembro de la Academia Nacional de Farmacia.

Lípidos en la fisiología y patología neuronal

Lipids in neuronal physiology and pathology



Jefe de Línea / *Group Leader:*
María Dolores Ledesma Muñoz

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ana Isabel Arroyo Tejedor
Azucena Pérez Cañamás
Estefanía Fernández López

Estudiantes /
Undergraduate Students:
María Gallego Serrano
Carolina Melero Jérez
Laura Martínez Prat

Resumen de investigación

Para cumplir el objetivo general de nuestro laboratorio, que es comprender la participación de los lípidos en la fisiología y patología neuronal, nos hemos concentrado durante este período en el estudio del colesterol y la esfingomielina. Estos lípidos están especialmente enriquecidos en neuronas y cambios en sus niveles se han relacionado con el envejecimiento y con enfermedades neurodegenerativas. Nuestros resultados demuestran que una de las causas de la disminución de colesterol, observado con la edad en el hipocampo, es la actividad sináptica. Ésta induce estrés oxidativo que a su vez activa la enzima que degrada colesterol Cyp46. Por otro lado, hemos descrito que el aumento de esfingomielina que se da en el hipocampo envejecido no es una mera consecuencia del proceso de envejecimiento sino que contribuye directamente a él, provocando un aumento del calcio intracelular y estrés oxidativo. De acuerdo con estos resultados descubrimos que ratones carentes de esfingomielinasa ácida, que sufren un aumento de los niveles de la esfingomielina en sus cerebros, presentan síntomas de envejecimiento prematuro.

Tanto la caracterización de los mecanismos moleculares por los que alteraciones en estos lípidos afectan a la fisiología neuronal como el hallazgo de ratones modelo facilitan el desarrollo de estrategias para evitar sus efectos perjudiciales. Este es el siguiente objetivo que persigue el laboratorio con el que esperamos aportar posibilidades para retrasar o disminuir el declive cognitivo que acompaña al envejecimiento y/o a enfermedades neurodegenerativas.

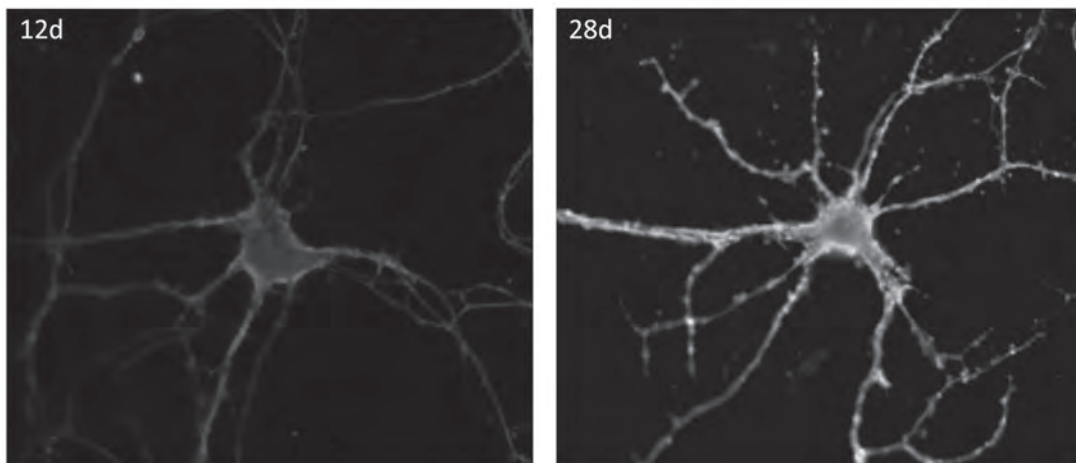


Figura 1. Neuronas hipocámpales en cultivo teñidas con Lisenina que reconoce específicamente la esfingomielina en la superficie celular. Se observa el incremento de los niveles de este lípido en neuronas envejecidas (28 días en cultivo) respecto a neuronas maduras (12 días en cultivo) de ratones silvestres.

Figure 1. Cultured hippocampal neurons labelled with lysenin, which specifically recognizes sphingomyelin at the cell surface. The images evidence the increase in sphingomyelin levels in aged neurons (28 days in culture) compared to mature neurons (12 days in culture) from wild type mice.

Research summary

To accomplish the general goal of our laboratory, which is to understand lipid influence in neuronal physiology and pathology, we have focused during this period in the analysis of cholesterol and sphingomyelin. These lipids are particularly enriched in neurons and changes in their levels have been related to aging and neurodegenerative diseases. Our results demonstrate that one of the causes for the loss of cholesterol observed in the aged hippocampus is synaptic activity. This activity induces oxidative stress that, in turn, activates the cholesterol-degrading enzyme Cyp46. On the other hand, we have found that the increase in sphingomyelin, which takes place in the aged hippocampus, is not only a consequence of the aging process but contributes directly to it through increasing intracellular calcium levels and oxidative stress. We unveil that mice lacking the acid sphingomyelinase, which present high sphingomyelin levels in their brains, show aging signs prematurely.

The characterization of the molecular mechanisms underlying the effects of the lipid alterations as well as the establishment of animal models facilitate the development of strategies aimed to prevent deleterious effects. This is our next goal. By pursuing it we hope to contribute with possibilities to delay or reduce the cognitive decline that accompanies old age and/or neurodegenerative diseases.

Publicaciones / Publications

Ledesma, M.D*, Prinetti, A., Sonnino, S., Schuchman, E.H. (2011) Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice. *J Neurochem.* **116**, 779-788. * corresponding author.

Sodero, A.O., Weissmann, C., Ledesma, M.D*, Dotti, C.G*. (2011) Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro. *Neurobiol Aging.* **32**, 1043-1053. * corresponding author.

Iannilli, F., Sodero, A.O., Ledesma, M.D., Dotti, C.G. (2011) Oxidative stress activates the pro-survival TrkA pathway through membrane cholesterol loss. *Neurobiol Aging.* **32**, 1033-1042.

Ledesma, M.D*, Dotti, C.G. (2012) Peripheral cholesterol, metabolic disorders and Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed).* **4**, 181-194. * corresponding author.

Ledesma M.D., Martin, M.G., Dotti, C.G. (2012) Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog Lipid Res.* **51**, 23-35.

Patentes / Patents

Ana I. Arroyo, Paola G. Camoletto, María Dolores Ledesma. Método para tratar la enfermedad de Niemann Pick tipo A y desórdenes neurológicos relacionados activando la esfingomielinasa neutral. Número P201131297. Fecha de presentación: 28 julio 2011.

Enfermedad de Huntington y otras enfermedades del sistema nervioso central

Huntington's disease and other CNS disorders



Jefe de Línea / *Group Leader:*
José Lucas

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Raquel Gómez Sintes
Cristina Tomás Zapico
Jesús Torres Peraza

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Marta Fernández Nogales
Zaira Ortega Llorente
Alberto Parras Rodríguez

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Miriam Lucas Santamaría
Alicia Tomico García

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Ivó Hernández Hernández

Resumen de investigación

La enfermedad de Huntington (EH), por ser hereditaria monogénica y dominante, resulta interesante para conocer las claves de la neurodegeneración en general. Con nuestro modelo animal inducible de EH demostramos que es necesario un aporte continuo de huntingtina mutada para que la enfermedad progrese y que la reversión es posible incluso en estadios avanzados con pérdida neuronal (Cell 101:57-66, 2000 y J. Neurosci. 25:9773-9781; 2005). Posteriormente exploramos la posible inhibición del sistema ubiquitina proteasoma (UPS) (J. Neurosci. 23:11653-61, 2003; J. Neurosci. 24:9361-71, 2004; Trends Neurosci. 27:66-69, 2004 y J. Neurochem. 98:1585-1596; 2006). Utilizando ratones reporteros de actividad UPS vimos que el sistema no está inhibido en el estado estacionario de los ratones con Huntington (PNAS 106:3986-91, 2009). Sin embargo, in vivo, la huntingtina mutada induce una inhibición del UPS, pero que ésta es transitoria pues se recupera a medida que las neuronas construyen los cuerpos de inclusión que acumulan la huntingtina (J. Neurosci 30:3675-88, 2010). También hemos explorado la posible alteración de GSK-3 en la EH (Cell Death Differ. 17:324-35, 2010) y el posible papel neuroprotector de los inhibidores de GSK-3. Respecto a esto último, vimos que, además del reportado efecto antiapoptótico, la inhibición de GSK-3 también puede ser proapoptótica en determinados paradigmas y tipos celulares (incluidas las neuronas estriatales) y que el mecanismo subyacente implica a NFAT y FAS (J. Clin. Invest. 120:2432-45, 2010). Actualmente estamos combinando ratones modelo de EH con ratones con alteraciones de la actividad GSK-3.

También analizamos alteraciones sinápticas (Rozas et al. Biochem Soc Trans. 38:488-92, 2010; Rozas et al. J. Neurosci. 31:106-13, 2011) y reportamos la acumulación de la alfa-sinucleína, en las inclusiones de huntingtina. Combinando ratones modelo de EH y ratones knock-out sin alfa-sinucleína demostramos la contribución de ésta a la patogénesis de la EH (Autophagy. 8:431-432, 2012; Hum. Mol. Genet. 25:495-510., 2012).

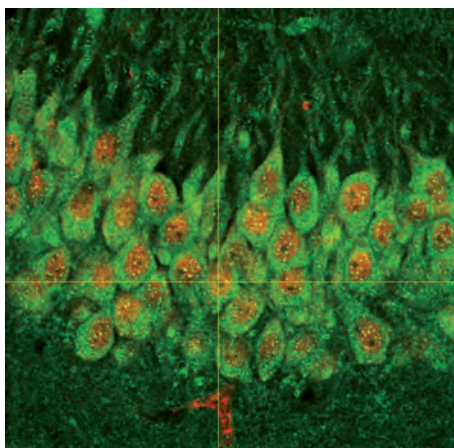


Figura 1. Expresión del factor de transcripción ATF5 en neuronas de hipocampo de ratón.

Figure 1. Expression of the transcription factor ATF5 in neurons of the mouse hippocampus.

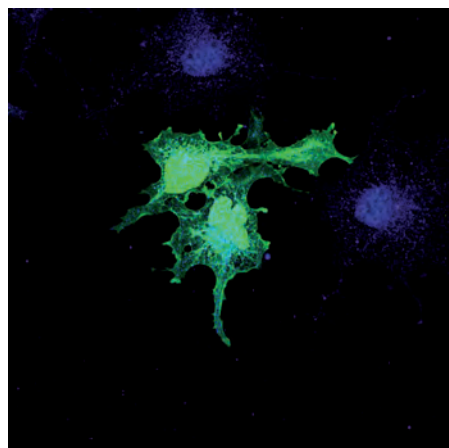


Figura 2. Células COS transfectadas con Green Fluorescent Protein (GFP).

Figure 2. COS cells transfected with Green Fluorescent protein (GFP).

Research summary

Huntington disease (HD), being inherited monogenic and dominant, is of particular interest to explore the mechanisms of neurodegeneration in general. Our work with the inducible animal model of HD showed that a continuous supply of mutant huntingtin is needed for the progression of disease and that reversal is still possible in advanced stages with neuronal loss (Cell 101:57-66, 2000 and J. Neurosci. 25:9773-9781, 2005). More recently we explored the possible inhibition of ubiquitin proteasome system (UPS) (J. Neurosci. 23:11653-61, 2003, J. Neurosci. 24:9361-71, 2004, Trends Neurosci. 27:66-69, 2004 and J. Neurochem. 98:1585-1596, 2006). By using UPS activity reporter mice we saw that the UPS is not inhibited at steady state in HD mice (PNAS 106:3986-91, 2009). However, in the past years we have seen that, in vivo, mutant huntingtin induces an inhibition of the UPS but this is temporary as it recovers as the neurons build inclusion bodies accumulating mutant huntingtin (J. Neurosci 30:3675-88, 2010).

Another issue we explored is the possible alteration of GSK-3 in HD (Cell Death Differ. 17:324-35, 2010) and the possible neuroprotective effect of GSK-3 inhibitors. Regarding the latter, we found that besides the reported antiapoptotic effect, inhibition of GSK-3 also can be proapoptotic in certain paradigms and cell types (including striatal neurons) and that the underlying mechanism involves NFAT and FAS (J. Clin. Invest. 120:2432-45, 2010). We are now combining EH mice with mice with alterations of GSK-3.

We recently analyzed synaptic alterations in animal models of EH (Rozas et al. Biochem Soc Trans. 38: 488-92, 2010; Rozas et al the. J. Neurosci. 31: 106-13, 2011) and reported accumulation of another synaptic protein, Alpha-synuclein, in huntingtin inclusions. By crossing EH mice and Alpha-synuclein knock-out mice we demonstrated its contribution to EH pathogenesis (Autophagy. 8: 431-432, 2012; Hum. Mol. Genet. 25: 495-510, 2012).

Publicaciones / Publications

Sirerol-Piquer, S., Gómez-Ramos, P., Hernández, F., Pérez, M., Morán, M.A.; Lucas, J.J., Ávila, J. and García-Verdugo, J.M. (2011) GSK3beta overexpression induces neuronal death, overproliferation and depletion of neurogenic niches in dentate gyrus. *Hippocampus* 21 (8):910-922.

Ávila, J., Hernández, F., Wandosell, F., Lucas, J.J., Esteban, J.A., Ledesma, M.D., and Bullido, M.J. (2010) Centro de Biología molecular "Severo Ochoa". A center for Basic Research into Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 21(2):325-335.

Ávila, J., Gómez de Barreda, E., Engel, T., Lucas, J.J., and Hernández, F. (2010) Tau phosphorylation in hippocampus results in toxic gain-of-function. *Biochem Soc Trans.* 38(4):977-980.

Sorolla, M.A., Rodríguez-Colman, M.J., Tamarit, J., Ortega, Z., Lucas, J.J., Ferrer, I., Ros, J. and Cabiscol, E. (2010) Protein oxidation in huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 49:612-621.

Fernández-Fernández, M.R., Ferrer, I. and Lucas, J.J. (2011) Impaired ATF6α processing, decreased Rheb and neuronal cell cycle re-entry in Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 41: 23-32.

Blázquez, C., Chiaroni, A., Sagredo, O., Aguado, T., Pazos, M.R., Resel, E., Palazuelos, J., Julien, B., Salazar, M., Börner, C., Benito, C., Carrasco, C., Díez-Zaera, M., Paoletti, P., Díaz-Hernández, M., Sendtner, M., Lucas, J.J., Yébenes, J.G., Marsicano, G., Monory, K., Lutz, B., Romero, J., Alberch, J., Ginés, S., Kraus, J., Fernández-Ruiz, J., Galve-Roperh, I. and Guzmán, M. (2011) Early loss of striatal CB1 cannabinoid receptors is critically involved in the pathogenesis of Huntington's disease. *Brain* 134:119-236.

Rozas, J.L., Gómez-Sánchez, L., Tomás-Zapico, C., Lucas, J.J. and Fernández-Chacón, R. (2011) Increased neurotransmitter release at the neuromuscular junction in a mouse model of polyglutamine disease. *J. Neurosci.* 31:106-113.

Saavedra, A., Giral, A., Xifró, X., Rué, L., Ortega, Z., Lucas, J.J., Lombroso, P.J., Alberch, J. and Pérez-Navarro, E. (2011) Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase expression and activity in Huntington's disease - a STEP in the resistance to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 31:8150-8162.

Díaz-Hernández, J.I., Gómez-Villafuentes, R., Leon-Otegui, M., Hotecillas-Prieto, L., del Puerto, A., Trejo, J.L., Lucas, J.J., Garrido, J.J., Gualix, J., Miras-Portugal, M.T. and Díaz-Hernández, M. (2011) In vivo P2X7R inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer Disease through GSK3beta and secretases. *Neurobiol Aging* 33(8):1816-1828.

Tomás-Zapico, C., Díez-Zaera, M., Ferrer, I., Gómez-Ramos, P., Morán, M.A., Miras-Portugal, M.T., Díaz-Hernández, M. and Lucas, J.J. (2012) Alpha-synuclein accumulates in huntingtin inclusions but forms independent filaments and its deficiency attenuates early phenotype in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 21(3):495-510.

Gómez-Sintes, R., Hernández, F., Lucas, J.J., and Ávila, J. (2011) GSK-3 mouse models to study neuronal apoptosis. *Front. Neurosci.* 2011; 4:45. Epub 2011 Nov 16.

Corrochano, S., Renna, M., Tomas-Zapico, C., Brown, S.D.M., Lucas, J.J., Rubinsztein, D.C. and Acevedo-Arozena, A. (2012) α-Synuclein levels affect autophagosome numbers in vivo and modulate Huntington disease pathology. *Autophagy* 8:431-432.

Carreton, O., Giral, A., Torres-Peraza, J.F., Brito, V., Lucas, J.J., Canals, J.M. and Alberch, J. (2012) Distinct roles of BDNF on synaptic plasticity and learning in the motor cortex and hippocampus. *Exp Neurol.* 237(2):335-345.

Hernández, F., Lucas, J.J. and Ávila, J. (2012) GSK3 and Tau: Two Convergence Points in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 33:S141-144.

Ávila, J., de Barreda, E.G., Fuster-Matanzo, A., Simón, D., Llorens-Martín, M., Engel, T., Lucas, J.J., Díaz-Hernández, M. and Hernández, F. (2012) Looking for novel functions of tau. *Biochem. Soc. Trans.* 40(4):653-5.

Borgonovo, J.E., Troncoso, M., Lucas, J.J., and Sosa, M.A. (2012) Mutant huntingtin affects endocytosis in striatal cells by altering the binding of AP-2 to membranes. *Exp Neurol.* 2012 Dec 5;241C:75-83.

Otras actividades / Other activities

Grupo integrante del Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)
<http://www.ciberned.es/grupo-lucas-lozano.html>.

José Lucas nombrado Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Junio de 2011.

Biología de células troncales neurales humanas. Potencial para reposición celular y terapia génica en neurodegeneración

Biology of human neural stem cells. Potential for cell and gene therapy in neurodegeneration



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Alberto Martínez Serrano

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Milagros Ramos Gómez
M^a Isabel Liste Noya
Marta Pérez Pereira

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Tania Ramos Moreno
Elisa García García
Emma M^a González Seiz
Silvia García López
Indumathi Vedarethinam

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
María José del Pino del Barrio
Nilabh Anand

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:

Beatriz Moreno Moreno
Beatriz García Martínez
Marta Gonzalez Mella

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Emma Green
Javier González Lendínez

Científicos visitantes /
Visiting Scientists:
Tamara Fernández Cabada

Resumen de investigación

Las enfermedades neurodegenerativas (p.ej. Parkinson, Huntington, etc.) cada vez son de mayor incidencia en países desarrollados, donde la expectativa de vida aumenta progresivamente. En algunos casos, los fármacos alivian algunos síntomas en etapas iniciales de la enfermedad, pero no la curan, al no frenar la atrofia o muerte de las neuronas implicadas.

La investigación en biología de células troncales humanas es de gran interés, para retrasar la progresión de estas enfermedades, o curarlas en el mejor de los casos. En nuestro grupo estamos interesados en el estudio de tres tipos de estas células: 1) Células troncales neurales, propias de tejido nervioso; 2) Células troncales derivadas de la masa celular interna del blastocisto (las llamadas "células madre embrionarias", hES), a partir de las cuales se pueden derivar células troncales con propiedades de tejido nervioso; y 3) iPSC (induced pluripotent stem cells), muy similares a las ES pero reprogramadas desde células somáticas del adulto.

Más en concreto, nos interesa el estudio de los mecanismos de auto-renovación (factores de nicho) de estas células, y su desarrollo hacia células maduras. En el caso de neuronas, estamos particularmente interesados en la generación del fenotipo Dopaminérgico, y así poder aplicar estas células en el desarrollo de potenciales terapias en modelos de Parkinson. Otro aspecto que nos interesa es el modificar las propiedades de las células troncales mediante modificación genética, para convertirlas en "bombas biológicas" de factores terapéuticos, o bien conseguir "instruirlas/enseñarlas", de forma que generen los tipos celulares deseados tras su implante. En este caso, estamos implantando la tecnología de nucleasas zinc-finger para poder llevar a cabo recombinación homóloga en las células humanas de interés. Por último, estamos desarrollando nanoherramientas para el estudio de la biología básica de las células, su marcaje y detección *in vivo*, y estudio de su biología en cultivo.

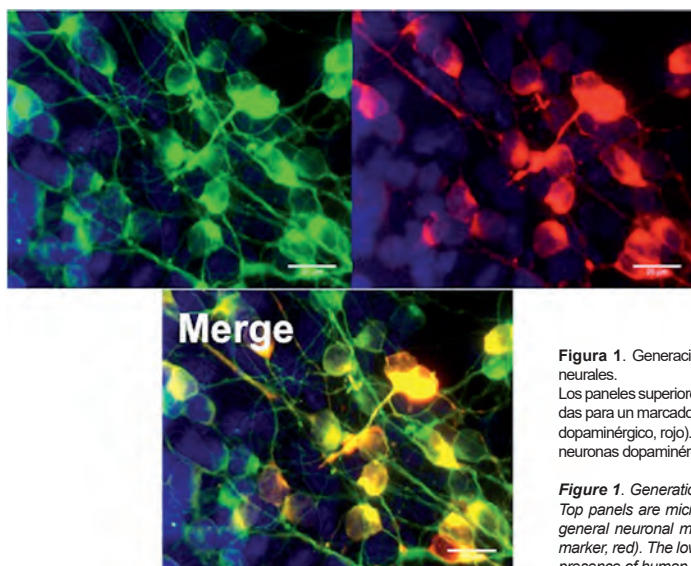


Figura 1. Generación de neuronas dopaminérgicas humanas a partir de células troncales neurales. Los paneles superiores son microfotografías de neuronas humanas generadas en cultivo, teñidas para un marcador general neuronal (β -III-tubulina, verde) y Tirosina Hidroxilasa (marcador dopaminérgico, rojo). El panel inferior es la mezcla, resaltando en amarillo las células que son neuronas dopaminérgicas.

Figure 1. Generation of human dopaminergic neurons from neural stem cells. Top panels are microphotographs of human neurons generated in culture, stained for a general neuronal marker (β -III-tubulin, green) and Tyrosine Hydroxylase (dopaminergic marker, red). The lower panel is a merge of the two photographs, highlighting in yellow the presence of human dopaminergic neurons.

Research summary

The incidence of neurodegenerative diseases is steadily increasing, particularly in well developed countries, due to the increase in life-expectancy. For some of them, like Parkinson's, Huntington's diseases, pharmaceutical drugs are useful at early stages of the disease, but none of them really cure the disease, since they do not halt the neuronal atrophy and death process.

In this context, research on the basic biology of human neural stem cells acquires special relevance, with the prospect that healthy stem cell derivatives, after implantation, would either delay disease progression or actually cure the disease.

Our research group is interested in understanding basic self-renewal (niche factors) and developmental events leading to maturation of stem cell derivatives, using: 1) Neural stem cells, obtained from fetal or adult human tissue, and thus instructed as neural cells; 2) Embryonic stem cells derived from the inner cell mass of the blastocist, (hES cells) from which neural stem cells can be derived; and 3) Induced pluripotent stem cells (iPSCs), reprogrammed from somatic adult cells.

Our main research focus is thus on basic cell growth and developmental events involved in the generation of mature cells, particularly of Dopaminergic neurons, to learn how to harness the potential that stem cells may have for therapy of these devastating diseases.

Another aspect in which we are interested on is the modification of the intrinsic properties of the neural stem cells through genetic modification, to turn them into "biological mini-pumps" (for instance for the secretion of neurotrophic factors) , or to instruct them or guide their differentiation towards specific, on-demand desired phenotypes after implantation. To this end we are implementing the technology of zinc-finger nucleases, to help to conduct homologous recombination. Last, we are developing nanotools to label and track the cells in vivo, and study their cell biology in culture.

Publicaciones / Publications

Martínez-Serrano A, Castillo CG, Courtois ET, García-García and Liste I (2011) Modulation of the generation of dopaminergic neurons from human neural stem cells by Bcl-XL. Mechanisms of action. *Vitam. Horm.* **87**, 175-205.

García-García, E., Pino-Barrio, M.J., López-Medina, L., and Martínez-Serrano, A. (2012) Intermediate progenitors are increased by lengthening of cell cycle through calcium signalling and p53 expression in human neural progenitors. *Mol. Biol. Cell.*, **23**, 1167-1180.

Fernández-Cabada, T., Sánchez-López de Pablo, C., Martínez-Serrano, A., del Pozo Guerrero, F, Serrano-Olmedo, J.J., Ramos-Gomez M (2012) Cell death induction in glioblastoma cell lines by hyperthermic therapy based on gold nanorods. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 1511-1523.

Ramos-Moreno, T., Castillo, C.G. and Martínez-Serrano, A. (2012) Long-term behavioral effects of functional dopaminergic neurons generated from human neural stem cells in the rat 6-OH-DA Parkinson's disease model. Effects of the forced expression of Bcl-XL. *Behav. Brain Res.*, **232**, 225-232.

Seiz, E.G., Ramos-Gómez, M., Courtois, E.T., Tønnesen, J., Kokaia, M., Liste I., and Martínez-Serrano, A., (2012) Human midbrain precursors activate the expected developmental genetic program and differentiate to functional A9 dopamine neurons in vitro. Short and Long term enhancement by Bcl-XL. *Experimental Cell Research* **318**: 2446-59.

Ramos-Moreno T., Lendínez J.G., Pino-Barrio MJ, del Arco, A., and Martínez-Serrano A (2012) Clonal human fetal ventral mesencephalic dopaminergic neuron precursors for cell therapy research. *PLoS One* **7**(12):e52714.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Javier Gonzalez Lendínez (2011). Identification and analysis of suitable human ventral mesencephalic precursors of dopaminergic neurons for cell therapy research in Parkinson's Disease. Universidad Autónoma de Madrid. Co-director: Dra. Tania Ramos Moreno.

Emma Green (2012). The use of zinc-finger nucleases to track the generation of dopaminergic neurons from immortalised human ventral mesencephalic neural stem cells. Universidad de Keele. Co-directores: Alberto Martínez Serrano y Tania Ramos Moreno.

Señalización mitocondrial del calcio y señalización de insulina/leptina en envejecimiento

Calcium signalling in mitochondria and insulin/leptin signalling during ageing

Jefe de Línea / *Group Leader*:
Jorgina Satrustegui Gil-Delgado

Personal Científico / *Scientific Staff*:
José M. Carrascosa Baeza
Elena Bogóñez Peláez
Beatriz Pardo Merino
Cayetano von Kobbe

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*:
Javier Traba Domínguez
(hasta Octubre 2011)
Laura Contreras Balsa
(desde Enero 2012)

Becarios Predoctorales / *Graduate Students*:
Ignacio Amigo de la Hueriga
Irene Llorente Folch
Alain Juan de Solís
(hasta Diciembre 2011)
Carlos Rueda Díaz
Paloma González Sánchez

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance*:

Bárbara Sesé Cobos
Isabel Manso Gavilán
Alejandro Arandilla

Estudiantes / *Undergraduate Students*:

Inés Juaristi Santos
Daniel Torralba Grajales (2011)
Alba del Río Lorenzo
(desde Octubre 2012)
Andrea Montero (2012)
Victor Castellano
(Octubre 2011 a Mayo 2012)
Paula Pérez Pardo
(Enero a Septiembre 2011)
Cristina Hernández Cortés
(Octubre 2011 a Septiembre 2012)
Cristina Hernández Cortés
(Octubre 2011 a Septiembre 2012)
Laura Buenasmañanas Noblejas (2011)

Científicos Visitantes / *Visiting Scientists*:

Araceli del Arco Martínez
(Universidad de Castilla-La Mancha)



Resumen de investigación

La entrada de Ca^{2+} en mitocondrias a través del uniportador de Ca^{2+} (CaU) es importante para la señalización por Ca^{2+} pero su persistencia en la mitocondria se asocia con disfunción mitocondrial y muerte celular. Estamos estudiando sistemas de señalización mitocondrial de Ca^{2+} que no requieran la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria, los transportadores mitocondriales de aspartato-glutamato (AGC) aralar y citrina, y los de ATP-Mg/Pi, o SCaMCs. Tanto AGCs como SCaMCs tienen dominios de unión a Ca^{2+} hacia el espacio intermembranas y se activan por Ca^{2+} extramitocondrial. Aralar y citrina, los AGCs de cerebro e hígado, son componentes de la lanzadera de NADH malato aspartato. Hemos mostrado que ambos AGCs se regulan por señales de Ca^{2+} menores de las requeridas para activar CaU y son esenciales para la transmisión de señales de Ca^{2+} muy pequeñas a la mitocondria neuronal y de la célula beta secretora de insulina. Por otro lado, los SCaMCs se activan a concentraciones de Ca^{2+} mayores, sugiriendo que estas concentraciones pueden activar simultáneamente la entrada de Ca^{2+} a través de CaU y la de ATP-Mg a través de SCaMCs. Estamos desarrollando modelos murinos con deficiencias en estos transportadores mitocondriales para estudiar el papel de Aralar/AGC1 y de los SCaMCs en patología humana.

El envejecimiento está asociado al desarrollo de resistencia a insulina. Recientemente describimos la presencia de hiperleptinemia en ratas viejas así como la presencia de resistencia central a la leptina y a la insulina. Nuestros resultados sugieren que la leptina podría estar implicada en el desarrollo durante el envejecimiento temprano de resistencia a insulina en el tejido adiposo, actuando a través del sistema nervioso central. Por el contrario, a edades avanzadas la leptina inhibe la acción de insulina tanto en tejido adiposo como en músculo actuando directamente sobre los tejidos. En la actualidad estamos investigando el posible papel de algunos péptidos gastrointestinales (grelina y CCK), implicados en la regulación de la acción central de leptina y/o insulina, así como del comportamiento alimentario, en el desarrollo de la resistencia a la insulina con la edad y la posibilidad de revertir los cambios asociados al envejecimiento mediante restricción calórica.

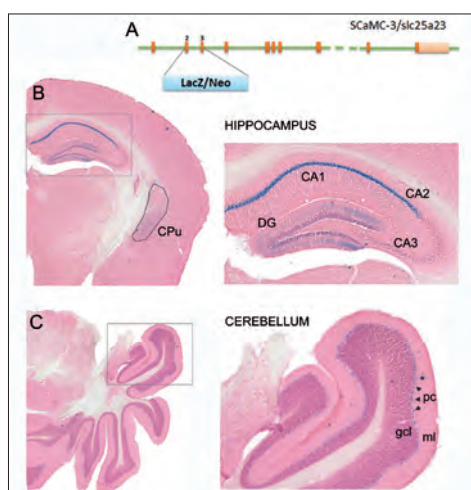


Figura 1. Análisis de la expresión de SCaMC-3/slc25a23 mediante tinción con X-gal en ratones portadores del gen lacZ. (A) Estructura genómica y diseño del ratón SCaMC-3/slc25a23-KO, un animal LacZ/Ki (B, C) Secciones coronales de animales SCaMC-3/slc25a23-KO teñidas con X-gal conteniendo hipocampo (B) y cerebelo (C). La expresión de SCaMC-3/slc25a23 se encuentra principalmente en hipocampo, caudado-putamen (CPu), bulbo olfatorio y cerebelo (C). En las regiones ampliadas se muestra la tinción con X-gal de las áreas CA1 y CA2 del hipocampo y en el giro dentado (DG). En cerebelo, la tinción con X-gal se encuentra asociada a las células de la capa de Purkinje (pc), y no se detecta en las capas granular (gcl) ni molecular (ml).

Figure 1. X-gal staining as reporter for SCaMC-3/slc25a23 expression in mice carrying the lacZ reporter gene. (A) Genomic structure and design of the SCaMC-3/slc25a23-knockout, lacZ-knock-in mouse. (B, C) Coronal sections containing the hippocampus (B) and the cerebellum (C) of the KO mice stained with X-gal. SCaMC-3/slc25a23 expression is found mainly in hippocampus, caudate putamen (CPu), olfactory bulb and cerebellum. The magnified areas show the X-gal staining of neurons of hippocampal areas CA1 and CA2 and the dentate gyrus (DG). In the cerebellum, X-gal staining is found associated to the Purkinje cell layer (pc), but not granular cell (gcl) or molecular layer (ml).

Research summary

Ca²⁺ entry in mitochondria through the Ca²⁺ uniporter (CaU) is important in cell Ca²⁺ signalling, but its persistence in mitochondria is associated with mitochondrial dysfunction and cell death. We are interested in the study of systems for Ca²⁺ signalling in mitochondria that do not require Ca²⁺ entry in the organelle, the mitochondrial carriers of aspartate-glutamate carriers (AGC) aralar and citrin, and of ATP-Mg/Pi, or Short CaMCs (SCaMCs). Both AGCs and SCaMCs have calcium binding domains facing the intermembrane space which are activated by Ca²⁺ without the need of calcium entry in mitochondria. Aralar and citrin, the brain and liver AGCs, are components of the malate-aspartate NADH shuttle. We have shown that both AGC isoforms are regulated by Ca²⁺ at concentrations lower than those required to activate CaU and are essential to transmit very small Ca²⁺ signals to brain or beta-cell mitochondria. On the other hand, Ca²⁺ concentrations activating SCaMCs are close to those activating CaU, indicating that these higher Ca²⁺ concentrations may stimulate simultaneously both Ca²⁺ entry along CaU and ATP entry along SCaMCs. We are developing mouse models with deficiencies in each of these mitochondrial transporters in order to study the role of aralar/AGC1 and the different SCaMC isoforms in human pathology.

Ageing associates with overall insulin resistance. We found hyperleptinemia in aged rats and demonstrated that aged animals show central leptin and insulin resistance. Our findings suggest that leptin might be involved in eliciting adipose tissue insulin resistance at early aging acting through the central nervous system. In contrast, at advanced age leptin decrease insulin action in both, fat and muscle, interacting directly with those tissues. We are currently interested in the study of the role of gastrointestinal peptides (ghrelin and CCK) that regulate central leptin and/or insulin action and ingestive behaviour, in the development of insulin resistance during aging and the possibility of reversing age-associated changes by caloric restriction.

Publicaciones / Publications

Pardo, B., Rodrigues, T.B., Contreras, L., Garzón, M., Llorente-Folch, I., Kobayashi, K., Saheki, T., Cerdán, S. and Satrustegui, J. (2011) Brain glutamine synthesis requires neuronal born aspartate as amino donor for glial glutamate formation. *J. Cerebr. Blood Flow & Metabolism* **31**, 90-101.

Traba, J., Satrustegui, J. and del Arco, A. (2011) Adenine nucleotides transporters in organelles: novel genes and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1183-1206.

Ramos, M., Pardo, B., Llorente-Folch, I., Saheki, T., del Arco, A. and Satrustegui, J. (2011) The deficiency in the mitochondrial transporter of aspartate/glutamate Aralar/AGC1 causes hypomyelination and neuronal defects unrelated to myelin deficits in mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **89**, 2008-2017.

Gómez-Galán, M., Makarova, J., Llorente-Folch, I., Saheki, T., Pardo, B., Satrustegui, J. and Herreras, O. (2012) Altered postnatal development of cortico-hipocampal neuronal electric activity in mice deficient for the mitochondrial aspartate-glutamate transporter *J. Cerebr. Blood Flow & Metabolism* **32**, 306-317.

Traba, J., del Arco, A., Duchon, M.R., Szabadkai, G. and Satrustegui, J. (2012) SCaMC-1 promotes cancer cell survival by desensitizing mitochondrial permeability transition via ATP/ADP-mediated matrix Ca²⁺ buffering. *Cell Death and Differentiation* **19**, 650-660.

Amigo, I., Traba, J., Satrustegui, J. and del Arco, A. (2012) SCaMC-1 Like a Member of the Mitochondrial Carrier (MC) Family Preferentially Expressed in Testis and Localized in Mitochondria and Chromatoid Body. *PLOS One* **7**, e40470.

Kipanyula, M.J., Contreras, L., Zampese, E., Lazzari, C., Wong, A.K., Pizzo, P., Fasolato, C., and Pozzan, T. (2012) PS2-N1411 causes early dysregulation of neuronal Ca²⁺ in transgenic mouse neurons. *Aging Cell* **11**, 885-893.

Carrascosa, J.M., Andrés, A., Ros, M., Bogóñez, E., Arribas, C., Fernández-Agulló, T., De Solís, A.J., Gallardo, N. and Martínez, C. (2011) Development of insulin resistance during aging: involvement of central processes and role of adipokines. *Curr. Prot. Pep. Sci.* **12**, 305-315.

Bonzón-Kulichenko, E., Fernández-Agulló, T., Moltó, E., Serrano, R., Fernández, A., Ros, M., Carrascosa, J.M., Arribas, C., Martínez, C., Andrés, A. and Gallardo, N. (2011) Regulation of insulin-stimulated glucose uptake in rat white adipose tissue upon chronic central leptin infusion: effects on adiposity. *Endocrinology* **152**, 1366-1377.

Horriño, D.I., Sierra, J., Arribas, C., García-San Frutos, M., Carrascosa, J.M., Fernández-Agulló, T. and Ros, M. (2011) Age-associated development of inflammation in Wistar rats: effects of caloric restriction. *Arch. Physiol. Biochem.* **117**, 140-150.

González-Rodríguez, A., Más-Gutiérrez, J.A., Mirasierra, M., Fernández-Pérez, A., Lee, Y.J., Ko, H.J., Kim, J.K., Romanos, E., Carrascosa, J.M., Ros, M., Vallejo, M., Rondinone, C.M. and Valverde, A.M. (2012) Essential role of protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-induced, inflammation and peripheral insulin resistance during aging. *Aging Cell* **12**, 284-296.

Quintas, A., De Solís, A.J., Díez-Guerra, F.J., Carrascosa, J.M. and Bogóñez, E. (2012) Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus. Prevention by late onset caloric restriction. *Exp. Gerontol.* **47**, 198-201.

De Solís, A.J., Fernández-Agulló, T., García-San Frutos, M., Pérez-Pardo, P., Bogóñez, E., Andrés, A., Ros, M. and Carrascosa, J.M. (2012) Impairment of skeletal muscle insulin action with aging in Wistar rats: role of leptin and caloric restriction. *Mech. Aging and Develop.* **133**, 306-316.

García-San Frutos, M., Fernández-Agulló, T., Carrascosa, J.M., Horriño, D., Barrús, M.T., Oliveros, E., Sierra, J.X. and Ros, M. (2012) Involvement of protein tyrosine phosphatases and inflammation in hypothalamic insulin resistance associated with aging: effect of caloric restriction. *Mech. Aging and Develop.* **133**, 489-497.

Martin Caballero, J., Garzón, A., González-Cintado, L., Kowalczyk, W., Jimenez Torres, I., Calderita, G., Rodríguez, M., Gondar, V., Bernal, J.J., Ardavin, C., Andreu, D., Zürcher, T., and von Kobbe, C. (2012) Chimeric infectious bursal disease virus-like particles as potent vaccines for eradication of established HPV-16 E7-dependent tumors. *PLoS One* **7**:e52976.

B. Pardo, J. & Contreras, L. (2012) Redox shuttles in the brain; in Gruetter R and Choi I, (eds) *Advances in Neurobiology*, 1, Volume 4, ww *In Vivo*, Part 3, Pages 841-883.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Alain Juan De Solís (2011). Acción de la insulina en el músculo esquelético de la rata Wistar: Efecto del envejecimiento, la restricción calórica y la leptina. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José M. Carrascosa.

Premios / Awards

Premio al mejor trabajo de investigación básica en diabetes realizado en Castilla-La Mancha. Premios FUCAMDI (Fundación de Castilla-La Mancha para la Diabetes) 2011. José M. Carrascosa, Araceli del Arco.

Bases genéticas de la enfermedad de Alzheimer: Estudio genómico de modelos celulares patogénicos

Genetic bases of Alzheimer's Disease: Genomic study of pathogenic cell models



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Fernando Valdivieso / María Jesús Bullido

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Jesús Aldudo Soto
María Recuero Vicente

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Diego Muñoz Santos

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Isabel Sastre Merlín

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Henrike Kristen
Victor-Anuar Munive
Beatriz Bustillo Ramírez
Manuel Manchón Rodríguez

Resumen de investigación

En los últimos años nuestro grupo se ha centrado en la búsqueda de factores de riesgo y/o genes implicados en la enfermedad de Alzheimer (EA), partiendo de modelos celulares para la obtención de candidatos que se validan mediante asociación genética en pacientes. Uno de los principales objetivos del grupo es establecer la implicación en la patogénesis de la EA de dos factores asociados al envejecimiento, el estrés oxidativo (EO) y la infección por HSV-1.

Hemos demostrado en los modelos celulares que el EO regula el tráfico, degradación y procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido A β (APP), y que esta regulación implica a los dos principales sistemas proteolíticos celulares: ubiquitina/proteasoma y autofagia/lisosoma. Por su parte, HSV-1 es capaz de reproducir la mayor parte de las anomalías que presentan los cerebros de pacientes con EA, como la hiperfosforilación de la proteína tau y alteraciones del proceso autofágico que conducen a la acumulación intracelular de A β , de forma más acentuada en presencia de EO. Tras el análisis genómico de los modelos, nos hemos centrado en la lista de genes cuya expresión se modula por HSV-1 en presencia de EO para su posterior validación funcional y por asociación con riesgo genético, ya que ésta sería la situación más parecida a la infección durante el envejecimiento: La función "inflamación mediada por citocinas" está muy enriquecida en esta lista, lo que concuerda con las conclusiones de los últimos estudios de asociación genómica (GWAs) y sugiere que HSV-1 podría participar en la patogénesis de la EA esporádica.

Otros trabajos del grupo en este período incluyen el análisis de modelos celulares de la EA monogénica y la participación en estudios colaborativos de asociación genética principalmente con grupos de CIBERNED y como parte del consorcio europeo EADI que están revelando nuevos factores de riesgo de EA.



Figura 1. El estrés oxidativo produce la acumulación de la proteína APP y sus fragmentos carboxi y amino terminales en las células neuronales SK-N-MC.

Figure 1. Oxidative stress produces the accumulation of APP protein and its carboxi and amino terminal fragments in SK-N-MC neuronal cells.

Research summary

In the last years our group has focused on the search of risk factors and/or genes involved in the Alzheimers disease (AD), developing cellular models to obtain candidates that are then validated through genetic association studies in patients. One of the main objectives of the group is to establish the involvement in the pathogenesis of AD of two factors associated with aging, oxidative stress (OS) and infection by HSV-1.

We have found that in the cell models OS regulates the traffic, degradation and proteolytic processing of the A β peptide precursor protein (APP), and that this regulation involves the two main cellular proteolytic systems: ubiquitin/proteasome and autophagy/lysosome. On the other hand, HSV-1 is able to reproduce most of the anomalies found in the brains of AD patients, as the hyperphosphorylation of tau protein and alterations of the autophagic process that lead to the intracellular accumulation of A β ; these effects are increased in the presence of OS.

After the genomic analysis of the cell models, we have focused on the list of genes which expression is modulated by HSV-1 in the presence of OS because this is similar to the infection in aged people for their functional validation and genetic risk association studies. The "cytokine-mediated inflammation" function is highly enriched in this list, which is consistent with the findings of the latest genome wide association studies (GWAs) and suggests that HSV-1 may participate in the pathogenesis of sporadic AD.

Other works of the group during this period include the analysis of cellular models of monogenic AD, and the participation in collaborative genetic association studies, mainly with groups of CIBERNED and as part of the European consortium EADI, which are revealing novel AD risk factors.

Publicaciones / Publications

Hollingsworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, et al. (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **43**: 429-435.

Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. (2011) APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry* **16**: 903-907.

Lambert JC, Zelenika D, Hiltunen M, Chouraki V, Combarros O, et al. (2011) Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations. *Neurobiol Aging* **32**: e711-755.

Vargas T, Martinez-Garcia A, Antequera D, Vilella E, Clarimon J, et al. (2011) IGF-I gene variability is associated with an increased risk for AD. *Neurobiol Aging* **32**: e553-511.

Vazquez-Higuera JL, Martinez-Garcia A, Sanchez-Juan P, Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, et al. (2011) Genetic variations in tau-tubulin kinase-1 are linked to Alzheimer's disease in a Spanish case-control cohort. *Neurobiol Aging* **32**: e555-559.

Vazquez-Higuera JL, Mateo I, Sanchez-Juan P, Rodriguez-Rodriguez E, Pozueta A, et al. (2011) Genetic variation in the tau protein phosphatase-2A pathway is not associated with Alzheimer's disease risk. *BMC Res Notes* **4**: 327.

Vazquez-Higuera JL, Mateo I, Sanchez-Juan P, Rodriguez-Rodriguez E, Pozueta A, et al. (2011) Genetic variation in the tau kinases pathway may modify the risk and age at onset of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **27**: 291-297.

Cervantes S, Samaranch L, Vidal-Taboada JM, Lamet I, Bullido MJ, et al. (2011) Genetic variation in APOE cluster region and Alzheimer's disease risk. *Neurobiol Aging* **32**: e2107-2117.

Calero O, Bullido MJ, Clarimon J, Frank-Garcia A, Martinez-Martin P, et al. (2011) Genetic cross-interaction between APOE and PRNP in sporadic Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob diseases. *PLoS One* **6**: e22090.

Alvarez G, Aldudo J, Alonso M, Santana S, Valdivieso F (2012) Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated tau in neuronal cells. *J Neurosci Res* **90**: 1020-1029.

Calero O, Bullido MJ, Clarimon J, Frank-Garcia A, Martinez-Martin P, et al. (2012) A common BACE1 polymorphism is a risk factor for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS One* **7**: e43926.

Santana S, Recuero M, Bullido MJ, Valdivieso F, Aldudo J (2012) Herpes simplex virus type I induces the accumulation of intracellular beta-amyloid in autophagic compartments and the inhibition of the non-amyloidogenic pathway in human neuroblastoma cells. *Neurobiol Aging* **33**: 430 e419-433.

Calero O, Bullido MJ, Clarimon J, Hortiguera R, Frank-Garcia A, et al. (2012) Genetic variability of the gene cluster CALHM 1-3 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion* **6**: 407-412.

Lambert JC, Grenier-Boley B, Harold D, Zelenika D, Chouraki V, et al. (2012) Genome-wide haplotype association study identifies the FRMD4A gene as a risk locus for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* **16**: 903-7

Santana S, Bullido MJ, Recuero M, Valdivieso F, Aldudo J (2012) Herpes simplex virus type I induces an incomplete autophagic response in human neuroblastoma cells. *J Alzheimers Dis* **30**: 815-831.

Premios / Awards

Fundación Madrid+D. Premio a las mejores patentes; accésit. (2011).

Sociedad Madrileña de Neurología. Premio Ramón y Cajal de Investigación básica.

Mecanismos moleculares de neurodegeneración y regeneración

Molecular mechanisms of neurodegeneration and regeneration

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Francisco Wandosell Jurado

Personal Científico / *Scientific Staff:*
M^a José Benítez Moreno
María José Pérez Álvarez

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Lara Ordoñez Gutiérrez
Jorge Rubén Cabrera
Ricardo Gargini (2010-2012)
Héctor Díez Nuño (hasta 2011)

Becarios / *Graduate Students:*
María Isabel Escoll
Irene Benito

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance:*
Nuria Peralta Cañadas
(hasta 2012)
Marta Antón

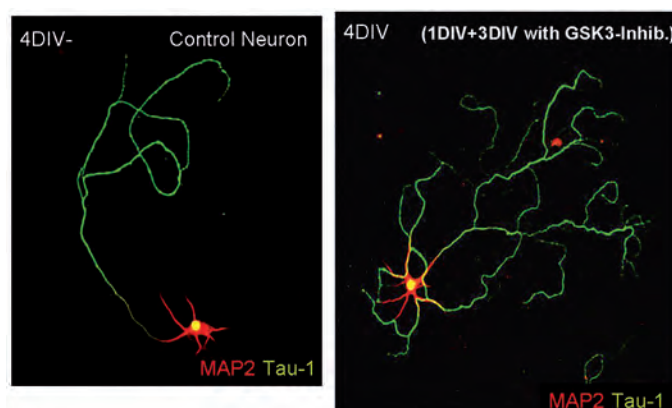
Resumen de investigación

Nuestro grupo se denomina -Mecanismos Moleculares de Neurodegeneración y Regeneración-, es una línea establecida en el CBM desde hace ya más algunos años. Como grupos estamos interesados en el análisis de los mecanismos moleculares disparados por procesos neurodegenerativos, intentando entender los puntos clave de estos procesos; para en un segundo intento diseñar alternativas regenerativas.

Primero, estamos interesados en el estudio de los mecanismos moleculares de la degeneración y se han centrado en el papel de la ruta PI3K-Akt: GSK3 en el neurodegeneración. Hemos visto como estradiol modula elementos, tales como GSK3 y β -catenin, elementos compartidos por otras vías de señalización como Wnt. Y así hemos demostrado recientemente que el estradiol puede accionar la vía Akt-mTORC1. Todos estos datos representan un nuevo sistema de señalización para esta hormona, que complementaría co las vías de IGF-1 y de Wnt. Estos resultados nos han conducido a ampliar el análisis de señalar mediado por Estradiol en fisiología neuronal normal y en algunas condiciones patológicas tales como modelos de la isquemia.

En segundo lugar y complementario estamos interesados en los mecanismos moleculares que regulan la generación y el mantenimiento de la polaridad del axonal. Esta polaridad morfológica aparece durante el desarrollo cuando la neurona distingue y comienza a extender un axon. "Se maduran" y forman posteriormente su segmento inicial del axon. Los estudios de varios laboratorios, incluyendo el nuestros han demostrado que la actividad de PI3K-kinase permite crecimiento del axonal y la determinación de polaridad del axonal (en colaboración con JJ. Grupo de Garrido's del Instituto Cajal). Nuestro laboratorio ha ayudado a identificar algunos de los elementos que controlan polaridad, tales que GSK3. Nuestro trabajo, en este campo, tratara de identificar los elementos upstream y downstream que serían esenciales para este "proceso morfogenético".

En resumen, todos estos resultados nos han llevado a extender el análisis de la señalización mediada por neuroprotección y en condiciones patológicas; centrándonos en la vía de señalización PI3K-Akt y de los elementos por debajo de estos elementos que controlan la morfogénesis neuronal y como están modificada en patología.



Research summary

Our group, “Molecular mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration”, is a line established in the CBM over several years. We are interested in the analysis of the molecular mechanisms fired by processes neurodegenerative, trying to understand the key points of these processes; for a second attempt to design new regenerative alternatives, or to propose new therapeutic targets.

First, our studies of molecular mechanisms of degeneration are focused on the role of PI3K-Akt: GSK3 in neurodegeneration. We have seen that some neuroprotective elements as estradiol modulates elements, such as GSK3 and β -catenin, proteins shared by other signaling pathways like Wnt. And we recently demonstrate that estradiol may trigger Akt-mTORC1 pathway. All these data represent a new signalling pathway, triggered by estradiol that would complement to IGF-1 and Wnt. These findings have led us to extend the analysis of signalling mediated by Estradiol in normal neuronal physiology and in some pathological conditions such as Ischemia model.

Second and complementary we are interested in the molecular mechanisms that regulate the generation and maintenance of the axonal polarity. This morphological polarity appears during development when the neuron differentiates and begins to extend an axon. Subsequently they “mature” and form their initial segment of the axon. Studies of several laboratories, including ours have shown that PI3K-kinase activity allows axonal growth and determining axonal polarity (in collaboration with J.J. Garrido’s group from Cajal Inst.). Our laboratory has helped identify some of the elements that control polarity, such that GSK3, control the polarity. Our work, in this field, will follow to identify upstream and downstream elements that would be essential for this “morphogenetic process”.

In summary, we are focusing on track PI3K-Akt signalling and elements than those elements that control neuron morphogenesis and are modified in pathology.

Publicaciones / Publications

Simon, D., Medina, M., Avila, J. and Wadosell, F. (2011) Overcoming cell death and tau phosphorylation mediated by PI3K-inhibition: a cell assay to measure neuroprotection. *Targets CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. **10**:208-214.

Medina, M. and Wadosell, F. (2011) Deconstructing GSK-3: The Fine Regulation of Its Activity. *Int J Alzheimers Dis*. 479249.

Franco, A., Knafo, S., Banon-Rodríguez, I., Merino-Serrais, P., Fernaud-Espinosa, I., Nieto, M., Garrido, J.J., Esteban, J.A., Wadosell, F., Antón, I.M. (2011) WIP is a negative regulator of neuronal and synaptic maturation. *Cerebral Cortex* **22**(5): 1191-1202.

Medina, M., Garrido, J.J. and Wadosell, F.G. (2011) Modulation of GSK-3 as a therapeutic strategy on Tau pathologies. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **4**:24. doi: 10.3389.

Wadosell, F., Varea, O., Arevalo, M. A., and García-Segura, L. M (2011). Oestradiol regulates beta-catenin-mediated transcription in neurons. *J Neuroendocrinol*. **24**(1): 191-194.

Nocentini, S., Reginensi, D., Garcia, S., Carulla, P., Moreno-Flores, M.T., Wadosell, F. Trepát, X., Bribian, A., del Río, J.A. (2012) Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single cell tracking and traction force microscopy. *Cellular and Molecular Life Sci*. **69**(10): 1689-1703.

del Puerto, A., Díaz-Hernández, J-I, Tapia, M., Gómez-Villafuentes, R., Benítez, M.J. Zhang, J., Miras-Portugal, MT., Wadosell, F. Díaz-Hernandez, M., and Garrido, J.J (2012) Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13, and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation. *Journal Cell Science* **125**(1): 176-188.

Diez, H. Garrido, J.J. and Wadosell, F. (2012) Specific roles of Akt isoforms in apoptosis and axon growth regulation in neurons. *Plos One* **7**:4 e32715.

Pérez-Álvarez, M.J., Maza, M.C., Anton, M., Ordoñez, L., and Wadosell F. (2012) Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. *Journal of Neuroinflammation* **9**:157.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Ana Franco Villanueva (2011). Caracterización del papel de WIP en morfogénesis neuronal. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Inés Antón Gutiérrez y Francisco Wadosell.

Otras actividades / Other activities

Master en Envejecimiento celular. Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid (2012).

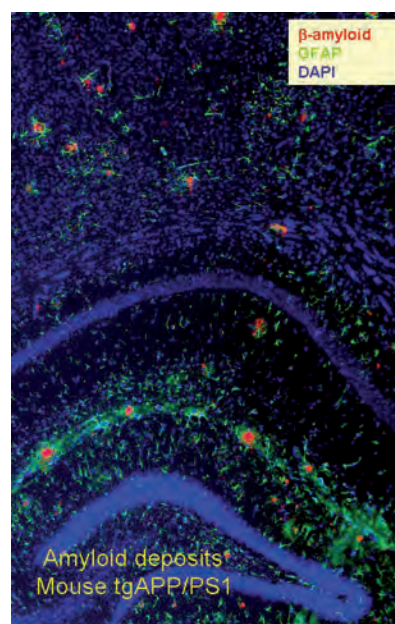
Este grupo también forma parte del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed): <http://www.cibermed.es/grupofranciscowadosell.aspx>

This group is also part of the Centre for biomedical research in neurodegenerative diseases network (CiberNed): <http://www.cibermed.es/grupofranciscowadosell.aspx>

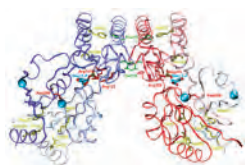
Colaboración con la Industria:

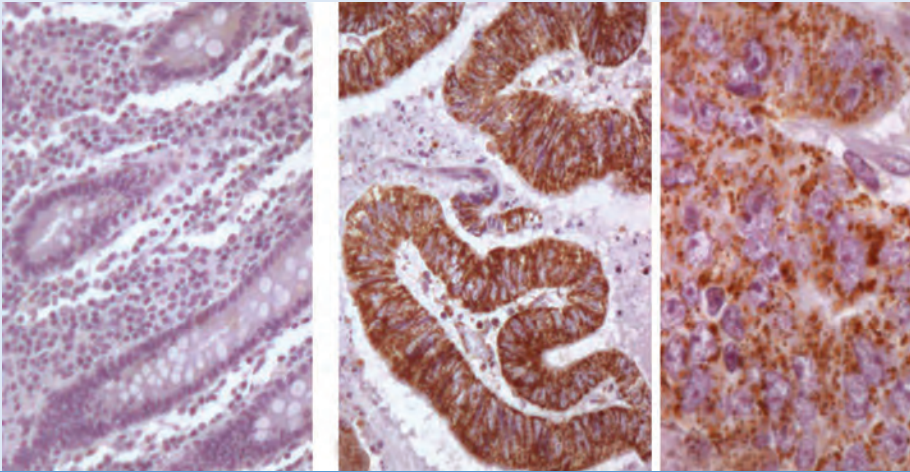
Acuerdo de Colaboración con FAES-FARMA (2011).

Acuerdo de Colaboración con NOSCIRA (2011).



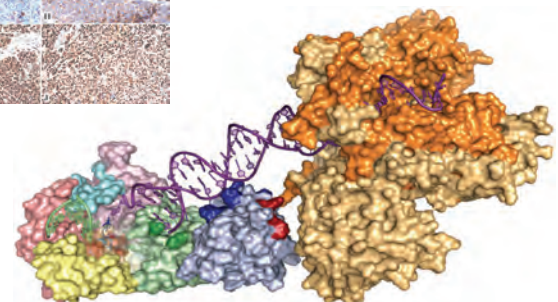
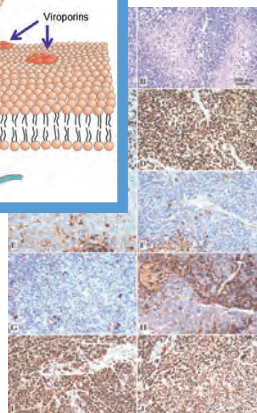
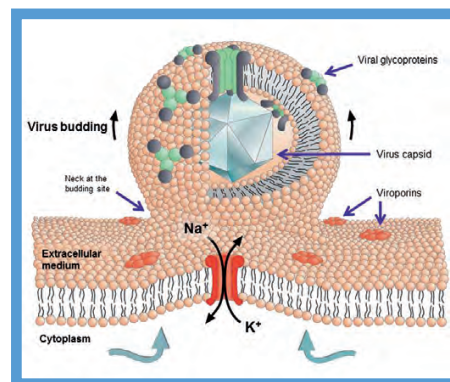
144	Mantenimiento y variabilidad del genoma: enzimología de la replicación y reparación de DNA <i>Genome maintenance and variability: enzymology of DNA replication and repair</i> Luis Blanco Dávila
146	Proteínas virales que alteran la expresión génica <i>Viral proteins that modify gene expression</i> Luis Carrasco Llamas
148	Biogénesis y función de la mitocondria y su repercusión en patología <i>Biogénesis and function of mitochondria and its role in pathology</i> José Manuel Cuezva Marcos
150	Síntesis de proteínas y su regulación en eucariontes <i>Protein synthesis and its regulation in eukaryotes</i> César de Haro Castella
152	Regulación post-transcripcional de la expresión génica en levaduras <i>Post-transcriptional Regulation of genetic expression in yeasts</i> Juan Pedro García Ballesta / Miguel Remacha Moreno
154	Organización funcional del genoma de mamíferos <i>Functional organization of the mammalian genome</i> María Gómez Vicentefranqueira
156	Replicación del DNA, división celular y cromatina <i>DNA replication, cell division and chromatin</i> Crisanto Gutiérrez Armenta
158	Redes reguladoras de la expresión génica <i>Gene expression regulatory networks</i> José María Izquierdo Juárez
160	Iniciación interna de la traducción en mRNAs eucarióticos <i>Internal initiation of translation in eukaryotic mRNAs</i> Encarnación Martínez-Salas
162	Regulación de la expresión génica en <i>Leishmania</i> <i>Regulation of gene expression in Leishmania</i> José María Requena Rolanía
164	Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias e investigación en nuevas terapias <i>Molecular basis of inherited metabolic diseases and research in novel therapies</i> Magdalena Ugarte / Lourdes Ruiz Desviat
166	Replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$ <i>Replication of bacteriophage $\phi 29$ DNA</i> Margarita Salas Falgueras
168	Replicación cromosómica y estabilidad del genoma <i>Chromosome replication and genome stability</i> José Antonio Tercero Orduña





DINÁMICA Y FUNCIÓN DEL GENOMA

Genome Dynamics and Function



Mantenimiento y variabilidad del genoma: enzimología de la replicación y reparación de DNA

Genome maintenance and variability: enzymology of DNA replication and repair



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Luis Blanco Dávila

Personal Científico /
Scientific Staff:
María Martínez Jiménez
José Francisco Ruiz Pérez

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Verónica Esteban Martín
Sandra Chocrón Benloulou

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
María José Martín Pereira
Ana Gómez Bedoya

Sara Inmaculada García Gómez
Ana Aza Montoya
Guillermo Sastre Moreno

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Susana Guerra González
Estefanía Martínez Jover

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Alberto Díaz Talavera

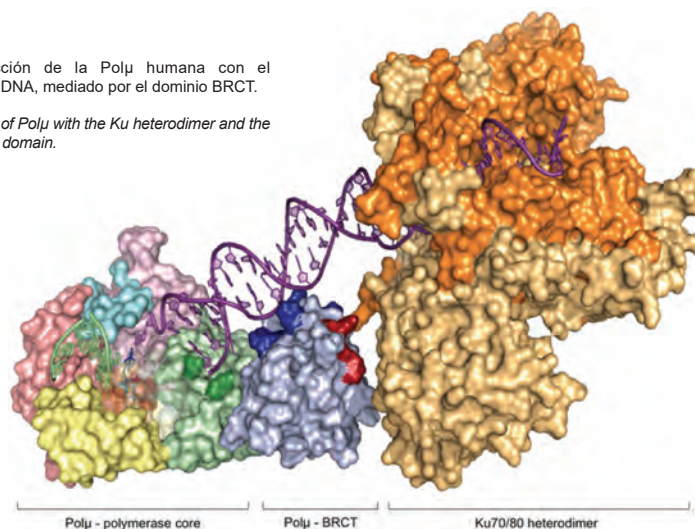
Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Abel Fernández Orgiler

Resumen de investigación

En los últimos 13 años, el grupo ha estudiado dos DNA polimerasas humanas implicadas en reparación de roturas de doble cadena de DNA (DSBs): Pol λ y Pol μ , descubiertas en nuestro laboratorio. Debido a su función en reparación de DSBs en extremos no homólogos (NHEJ), estas dos enzimas son esenciales para mantener la estabilidad genómica, así como para la variabilidad necesaria en determinados genes, como los receptores de antígeno. Estamos analizando mutantes dirigidos y versiones quiméricas de estas dos DNA polimerasas para aclarar la base estructural de su diferente especificidad y eficiencia catalítica. El análisis *in vivo* de la función de Pol λ y Pol μ se está llevando a cabo mediante modelos celulares y murinos deficientes en una o en ambas enzimas, centrándonos en su impacto en la estabilidad genómica, envejecimiento y desórdenes neurológicos. En colaboración con Aidan Doherty (GSDC, Univ Sussex, UK) hemos caracterizado, estructural y funcionalmente, la polimerasa implicada en NHEJ, que también opera en algunas bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, y evidenciado el paralelismo mecanístico con Pol λ y Pol μ . Tratando de encontrar ortólogos putativos de este nuevo grupo de enzimas reparadoras de DNA, hemos caracterizado una nueva primasa/polimerasa (PrimPol) en células humanas, que parece estar implicada en tolerancia al daño durante la replicación del DNA nuclear y mitocondrial. Datos preliminares, en colaboración con Ian Holt (MRC, UK), sugieren un vínculo de esta enzima con el mantenimiento del DNA mitocondrial, y posiblemente su deficiencia podría estar relacionada con algunas mitocondriopatías humanas. En colaboración con Juan Méndez (CNIO, Madrid), estamos estudiando el papel de PrimPol en la replicación del DNA nuclear, especialmente en respuesta a estrés replicativo. Además, hemos obtenido un modelo murino viable deficiente en PrimPol (KO), que será caracterizado prestando especial atención a los fenotipos dependientes de la función mitocondrial, y a su valor como modelo de envejecimiento y tumorigénesis.

Figura 1. Modelo de interacción de la Pol μ humana con el heterodímero Ku y el sustrato de DNA, mediado por el dominio BRCT.

Figure 1. Model of the interaction of Pol μ with the Ku heterodimer and the DNA substrate, through the BRCT domain.



Research summary

Since the last 13 years, our group is focused in the study of two eukaryotic DNA polymerases involved in DNA double-strand break repair (DSBs) in humans: Pol λ and Pol μ , discovered in Blanco laboratory. Due to their role in the Non-Homologous-End-Joining (NHEJ) pathway of DSB repair, these two enzymes are crucial to maintain genome stability, but also to generate the required variability to specific genes, i.e. antigen receptors. Site-directed mutants and chimaeric versions of these two DNA polymerases are being analyzed to unravel the structural basis of their different specificity and catalytic efficiency. In vivo analysis of Pol λ and Pol μ function is being carried out by using cellular and mouse models of deficiency in one or both of these enzymes, particularly on their impact in genomic stability, aging and neurological disorders.

In collaboration with Aidan Doherty (GSDC, Univ Sussex, UK) we have also characterized the polymerase involved in the NHEJ pathway of some bacteria as *Mycobacterium tuberculosis*, whose mechanism is convergent with that of Pol λ y Pol μ . Trying to find putative orthologues of this new group of DNA repair enzymes, we have recently characterized a novel primase/polymerase (PrimPol) in human cells that appears to be involved in damage tolerance during replication of both nuclear and mitochondrial DNA. Preliminary data, in collaboration with Ian Holt (MRC, UK), suggests a role of this enzyme in mitochondrial DNA maintenance, and perhaps its deficiency could be at the heart of some human mitochondrialriopathies. In collaboration with Juan Méndez (CNIO, Spain) we are studying the role of PrimPol in nuclear DNA replication, specifically in response to replicative stress. Moreover, we have obtained a mouse model of PrimPol deficiency (KO) which is viable, and that will be characterized paying special attention at mitochondrial-dependent phenotypes, and at its value as a model for aging and tumorigenesis.

Publicaciones / Publications

Brissett, N. C., Martin, M. J., Pitcher, R. S., Bianchi, J., Juarez, R., Green, A. J., Fox, G. C., Blanco, L. and Doherty, A. J. (2011) Structure of a preternary complex involving a prokaryotic NHEJ DNA polymerase. *Mol Cell*. **41**, 221-231.

Sánchez-Berrondo, J., Mesa, P., Ibarra, A., Martínez-Jiménez, M., Blanco, L., Méndez, J., Boskovic, J. and Montoya, G. (2012) Molecular architecture of a multifunctional MCM complex. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1366-1380.

Martín, M. J., Juarez, R. and Blanco, L. (2012) DNA-binding determinants promoting NHEJ by human Pol μ . *Nucleic Acids Res.* **40**, 11389-11403.

Martín, M.J., Garcia-Ortiz, M.V., Esteban, V. and Blanco L. (2012) Ribonucleotides and manganese ions improve non-homologous end joining by human Pol μ . *Nucleic Acids Res.* PMID: 23275568.

Patentes / Patents

Autores: Luis Blanco, Angel Picher. Título: "Method for Genotyping". Número de prioridad: P056358WO S001. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: PCT enviado en febrero de 2012. Propietario: X-Pol Biotech S.L.

Otras actividades / Other activities

Organización del Cantoblanco Workshop: "Polymerases involved in DNA replication, repair and mutagenesis". Organizado por Margarita Salas, Luis Blanco, Robert P. Fuchs y Miguel García-Díaz. Universidad Autónoma de Madrid. 5-7 de junio de 2012.

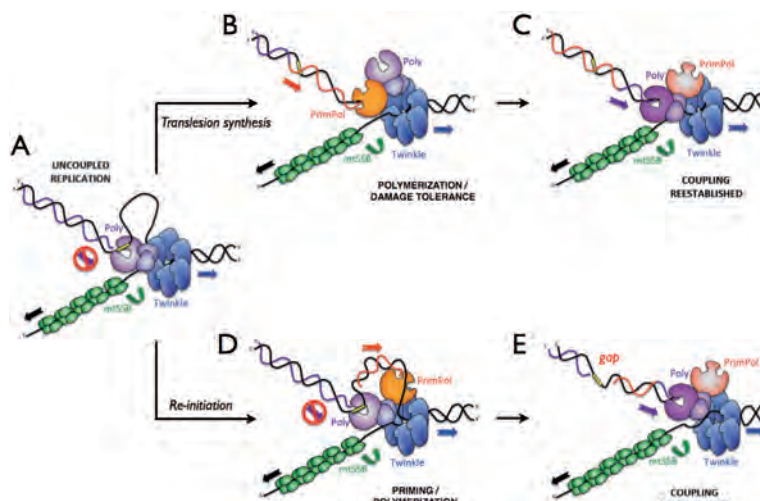
Coordinador del módulo (BM6): "Estabilidad de la Información Genética: Replicación, Reparación y Mutagénesis", correspondiente al Master de Biología Molecular y Celular, impartido por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Maria José Martín Pereira (2011). Exclusive polymerases repairing DNA breaks, the same magics from bacteria to man. Universidad Autónoma de Madrid. Luis Blanco Dávila.

Figura 2. Modelo de la función de PrimPol en la replicación del DNA mitocondrial. Cuando Poly se pausa o detiene en una lesión en el DNA mitocondrial (A), PrimPol puede llevar a cabo la extensión a través de la lesión (B), gracias a su elevada tolerancia al daño en el DNA, o sintetizar un nuevo iniciador por delante de la lesión (D). Posteriormente, Poly reestablecerá la polimerización de modo acoplado a la apertura de la horquilla por la helicasa TWINKLE (C y E).

Figure 2. A model for PrimPol function in mtDNA replication. When Poly is paused/stalled at a lesion in mitochondrial DNA (A), PrimPol can either catalyze conventional translesion synthesis, very efficient for lesion bypass (B), or synthesize a new primer ahead of the lesion (D). Afterwards, Poly re-establishes polymerization coupled to fork opening by TWINKLE helicase (C and E).



Proteínas virales que alteran la expresión génica

Viral proteins that modify gene expression

Jefe de Línea / Group Leader:

Luis Carrasco Llamas

Personal Científico / Scientific Staff:

Miguel Angel Sanz Fernández

(Titulado técnico superior)

Contratado Postdoctoral /

Postdoctoral Fellow:

Enrique Álvarez Gómez

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Ruth Alonso Valledor

Pablo Moral López

Natalia Redondo Sevillano

Ewelina Welnowska

Manuel García Moreno

Técnicos de Investigación /

Technical Assistance:

Juan Francisco Fernández García

Carmen Hermoso Crispín

Diana Pisa García

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Esther González Almela

Resumen de investigación

Nuestro grupo está investigando distintas proteínas virales que producen daño en las células de mamífero durante la replicación viral. También estamos analizando los mecanismos que regulan la traducción de mRNAs virales y celulares. Nos hemos centrado en dos grupos de proteínas citopatógenas virales: proteasas y viroporinas. Además, hemos dedicado parte de nuestros esfuerzos a elucidar la presencia de infecciones fúngicas como posibles causantes de diversas enfermedades humanas de etiología desconocida.

Proteínas virales. Recientemente hemos revisado las distintas viroporinas y su modo de actuación. Estas proteínas están codificadas por distintos virus y tienen efectos adversos sobre distintas funciones celulares. La principal acción de las viroporinas en el ciclo viral es facilitar la salida de nuevas partículas virales de las células infectadas (Figura 1).

Nuestro grupo ha dedicado especial atención al estudio de las proteasas de picornavirus y del HIV. Se ha estudiado el efecto de estas proteasas sobre la traducción de diversos mRNAs y su correlación con la hidrólisis de distintos factores. Notablemente hemos encontrado que las proteasas 2A y L de picornavirus son capaces de dar independencia del factor eIF2 para la traducción de los mRNAs virales.

Regulación de la traducción. Hemos descrito que algunos mRNAs virales se pueden traducir por un mecanismo dual y que requieren distintos factores de iniciación en función del contexto de la traducción. El virus Sindbis constituye un buen modelo para estos estudios. La traducción del mRNA subgenómico de este virus no utiliza diversos factores de iniciación de la traducción. Recientemente hemos descrito la independencia del eIF4A en las células infectadas, pero este factor lo requiere en sistemas de traducción in vitro. Se están llevando a cabo distintas construcciones que varían la estructura de este mRNA viral para determinar con exactitud su mecanismo de traducción.

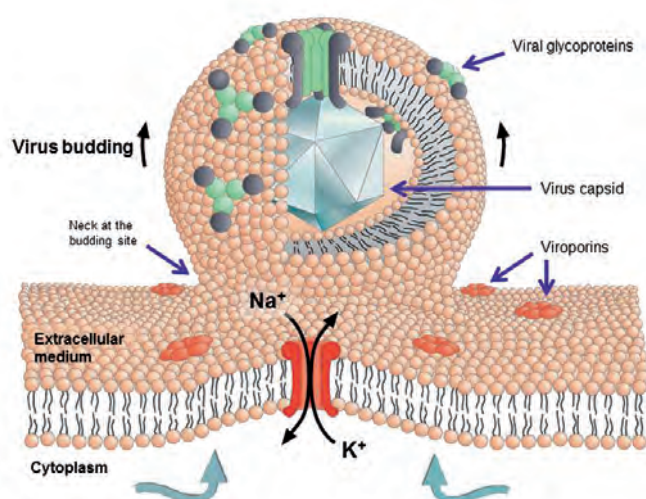


Figura 1. Las viroporinas promueven la gemación de nuevas partículas virales de las membranas celulares.

Figure 1. Viroporins promote the budding of new virus particles from cellular membranes.

Research summary

Our research group is studying different viral proteins that are harmful for mammalian cells during viral replication. We are also analysing the mechanisms that regulate translation of cellular and viral mRNAs. We have focused our attention on two groups of cytopathogenic viral proteins: proteases and viroporins. In addition, we have devoted part of our research efforts to elucidate the presence of fungal infections as potential cause of several human diseases of unknown etiology.

Viral proteins. Recently, we have revised the different existing viroporins and their mode of action. These proteins are encoded by a variety of viruses and exhibit adverse effects on several cellular functions. The main activity of viroporins during the virus life cycle is to promote the exit of new virus particles from infected cells (Figure 1).

Our group has dedicated particular attention to the study of picornavirus and HIV proteases. We have examined the effect of these proteases on translation of several mRNAs and the correlation with the hydrolysis of different translation factors. Notably, we have found that picornavirus proteases 2A and L are able to confer independence for eIF2 during the translation of viral mRNAs.

Regulation of translation. We have described that some viral mRNAs are translated by a dual mechanism and require different initiation factors according to the context of their translation. Sindbis virus constitutes a good model system for these studies. Translation of the subgenomic mRNA from this virus does not utilize several initiation factors. Recently, we have described the eIF4A independence for the translation of this subgenomic mRNA in the infected cells, but this factor is necessary for translation in cell free systems. At present, we are carrying out different constructs that modify the structure of this subgenomic mRNA to determine with more precision its mechanism of translation.

Publicaciones / Publications

Yángüez, E., Castelló, A., Welnowska, E., Carrasco, L., Goodfellow, I. and Nieto, A. (2011) Functional impairment of eIF4A and eIF4G factors correlates with inhibition of influenza virus mRNA translation. *Virology* **413**, 93-102.

Pisa, D., Alonso, R. and Carrasco, L. (2011) Fungal infection in a patient with multiple sclerosis. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 1173-1180.

Castelló, A., Alvarez, E. and Carrasco, L. (2011) The multifaceted poliovirus 2A protease. Regulation of gene expression by picornavirus proteases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:369648.

Welnowska, E., Sanz, M.A., Redondo, N. and Carrasco, L. (2011) Translation of viral mRNA without active eIF2: the case of picornaviruses. *PLoS One*, **6**(7), e22230.

Alvarez, E., Castelló, A., Carrasco, L. and Izquierdo, J.M. (2011) Alternative splicing, a new target to block cellular gene expression by poliovirus 2A protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 142-147.

Martínez-Gil, L., Bañó-Polo, M., Redondo, N., Sánchez-Martínez, S., Nieva, J.L., Carrasco, L. and Mingarro, I. (2011) Membrane integration of poliovirus 2B viroporin. *J. Virol.* **85**, 11315-11324.

Redondo, N., Sanz, M.A., Welnowska, E. and Carrasco, L. (2011) Translation without eIF2 promoted by poliovirus 2A protease. *PLoS One* **6**, e25699.

Buzón, M.J., Erkizia, I., Pou, C., Minuesa, G., Puertas, M.C., Esteve, A., Castelló, A., Santos, J.R., Prado, J.G., Izquierdo-Useros, N., Pattery, T., VanHoutte, M., Carrasco, L., Clotet, B., Ruiz, L., and Martínez-Picado, J. (2012) A Non-infectious Cell-based Phenotypic Assay for the Assessment of HIV-1 Susceptibility to Protease Inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**(1), 32-38.

Nieva, J.L., Madan, V. and Carrasco, L. (2012) Viroporins: structure and biological functions. *Nature Rev. Microbiol.* **10**, 563-574.

Redondo, N., Sanz, M.A., Steinberger, J., Skern, T., Kousov, Y. and Carrasco, L. (2012) Translation directed by hepatitis A virus IRES in the absence of active eIF4F complex and eIF2. *PLoS One* **7**(12), e52065.

Sánchez-Martínez, S., Madan, V., Carrasco, L. and Nieva, J.L. Membrane-active peptides derived from picornavirus 2B viroporin. *Current Protein Pept. Sci.* **13**, 632-643 (2012).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Natalia Redondo Sevillano (2012). Requerimiento de factores de iniciación para la traducción de mRNAs de picornavirus. Universidad Autónoma de Madrid. Luis Carrasco/Vanesa Madan/Miguel Ángel Sanz.

Ewelina Welnowska (2012). Independencia de factores de iniciación en la traducción de los mRNAs virales. Universidad Autónoma de Madrid. Luis Carrasco/Alfredo Castelló.

Biogénesis y función de la mitocondria y su repercusión en patología

Biogenesis and function of mitochondria and its role in pathology



Jefe de Línea / Group Leader:
José Manuel Cuezva Marcos

Personal Científico /
Scientific Staff:
María Sánchez-Aragó
Laura Formentini

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Inmaculada Martínez Reyes

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Imke Willers
Laura Sánchez-Cenizo
Fulvio Santacatterina
Javier García Bermúdez
Estela Casas López
Carmen Cuevas Martín

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Margarita Chamorro Bello
Cristina Núñez de Arenas Flores
Estefanía Martínez Jover

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Irene Medel Serrano
David López Martínez

Científicos visitantes /
Visiting Scientists:
Mariví Cascajo Almenara
(CIBERER, Sevilla)
Clara Linares
(Hospital Reina Sofía, Córdoba)
Joana Cerveira (Coimbra University)
Jone López-Erauskin (CIBERER,
Barcelona)

Resumen de investigación

Papel de la mitocondria en patología humana. Nuestro objetivo es la caracterización de los mecanismos celulares y moleculares que regulan la actividad de la mitocondria en células de mamífero. Fundamentalmente, estudiamos el complejo de la H^+ -ATP sintasa, cuello de botella de la generación de energía biológica en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que también está implicado en la ejecución de la muerte celular. Por la implicación evidente que la mitocondria tiene en patología humana (envejecimiento, cáncer, diabetes, neurodegeneración y enfermedades raras) hacemos especial hincapié en el estudio de aquellos mecanismos que conducen a la expresión de un fenotipo mitocondrial aberrante. En particular, de aquellos que se asocian con defectos primarios de la cantidad y/o actividad de la H^+ -ATP sintasa. Recientemente, hemos demostrado: (i) que la regulación de la expresión de la subunidad catalítica (β -F1-ATPase) de la H^+ -ATP sintasa humana se ejerce a nivel de la traducción durante el desarrollo y en oncogénesis (Fig. 1A); (ii) hemos caracterizado los mecanismos y vías de señalización que promueven la reprogramación metabólica de células tumorales (Fig. 1B) y (iii) documentado que muchos carcinomas humanos sobre-expresan el Factor de Inhibición 1 de la ATP sintasa (IF1) (Fig. 2A). Contrariamente a lo descrito previamente, hemos demostrado que IF1 actúa *in vivo* como un inhibidor de la actividad sintasa de la H^+ -ATP sintasa (Fig. 2B). La sobre-expresión de IF1 desencadena la inhibición de la OXPHOS y consecuentemente promueve la reprogramación metabólica de la célula tumoral a una glucólisis aeróbica más activa (Fig. 2B). Además, mediante la inhibición de la actividad de la H^+ -ATP sintasa, se genera una señal de especies reactivas de oxígeno (ROS) que desencadena en el núcleo una respuesta adaptativa, que es específica de tipo celular, encaminada a promover la proliferación y resistencia a muerte (Fig. 2B). Además, hemos desarrollado ratones transgénicos condicionales específicos de tejido que permiten la expresión regulada de IF1 para profundizar en la caracterización de las funciones biológicas de IF1.

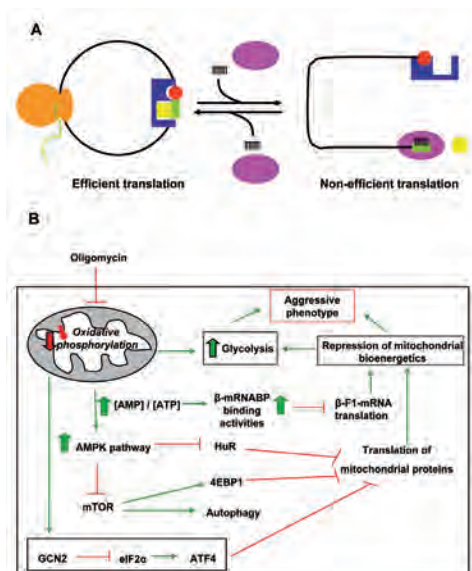


Figura 1. A, miR-127-5p (peine) se une al 3'UTR (verde) del mRNA de β -F1-ATPase e inhibe su traducción. B, La activación de las quinasas de estrés AMPK y GCN2 median la reprogramación metabólica en células de carcinoma de colon.

Figure 1. A, miR-127-5p (comb) targets the 3'UTR (green) of β -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. B, Activation of the stress kinases AMPK and GCN2 mediate metabolic reprogramming in colon cancer cells.

Research summary

The Role of Mitochondria in Human Pathology: We are interested in the characterisation of the cellular and molecular mechanisms that regulate the activity of mitochondria in cells of mammals. Our studies are focused on the H^+ -ATP synthase complex, the enzyme system that is bottle-neck for the generation of biological energy by oxidative phosphorylation (OXPHOS) and that is also required for the execution of cell death. Because mitochondrial dysfunction is at the heart of different human pathologies (ageing, cancer, diabetes, neurodegeneration and rare diseases) we pay particular emphasis to the study of the mechanisms that promote an aberrant mitochondrial phenotype. More specifically, of the mechanisms associated with primary defects affecting the expression and/or activity of the H^+ -ATP synthase. Recently, we have demonstrated: (i) that regulation of the expression of the catalytic subunit (β -F1-ATPase) of the human H^+ -ATP synthase is exerted at the level of translation both during development and in oncogenesis (Fig. 1A); (ii) characterized the mechanisms and signalling pathways that promote metabolic rewiring in cancer cells (Fig. 1B) and (iii) demonstrated that many prevalent human carcinomas over-express the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) (Fig. 2A). In contrast to previous suggestions, we have demonstrated that IF1 acts *in vivo* as an inhibitor of the H^+ -ATP synthase (Fig. 2B). Mechanistically, the over-expression of IF1 triggers the inhibition of OXPHOS promoting metabolic rewiring of the cancer cell to an enhanced aerobic glycolysis (Fig. 2B). Moreover, by blocking the activity of the H^+ -ATP synthase, IF1 promotes a ROS signal that orchestrates the transcriptional activation of a cell-type specific adaptive response to favour an enhanced proliferation and cell death resistance (Fig. 2B). Moreover, we have developed conditional tissue-specific transgenic mice to inhibit the activity of the H^+ -ATP synthase by the regulated expression of IF1 to deepen in the molecular characterization of the biological functions of IF1.

Publicaciones / Publications

Sánchez-Aragó M, Formentini L, García-Bermúdez J, Cuezva JM. (2012) IF1 reprograms energy metabolism and signals the oncogenic phenotype in cancer. *Cell Cycle* **11**, 2963-2964.

Formentini L, Sánchez-Aragó M, Sánchez-Cenizo L, Cuezva JM. (2012) The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde pro-survival and proliferative response. *Mol. Cell* **45**, 731-742.

Martínez-Reyes I, Sánchez-Aragó M, Cuezva JM. (2012) AMPK and GCN2-ATF4 signal the repression of mitochondria in colon cancer cells. *Biochem. J.* **444**, 249-259.

Willers IM, Martínez-Reyes I, Martínez-Díez M, Cuezva JM. (2012) miR-127-5p targets the 3'UTR of human β -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1817**, 838-848.

Sánchez-Aragó, M. y Cuezva, J.M. (2012) "La mitocondria: un nuevo paradigma en oncología". En: López-Pérez, M.J, Ortiz Melón, J.M. y Doadrio Villarejo, A. (eds) Sistema Mitocondrial: Un reto en la Medicina Humana, Real Academia Farmacia, Madrid, pp. 47-67.

Aldea M, Clofent J, Núñez de Arenas C, Chamorro M, Velasco M, Berrendero JR, Navarro C, Cuezva JM. (2011) Reverse phase protein microarrays quantify and validate the bioenergetic signature as biomarker in colorectal cancer. *Cancer Lett.* **311**, 210-218.

Sánchez-Aragó M, Cuezva JM. (2011) The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluorouracil. *J. Transl. Med.* **9**, 19.

Willers IM, Cuezva JM. (2011) Post-transcriptional regulation of the mitochondrial H^+ -ATP synthase: a key regulator of the metabolic phenotype in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1807**:543-551.

Patentes / Patents

Fulvio Santacatterina, María Sánchez-Aragó y José M. Cuezva. "Un proceso y kit para el diagnóstico diferencial de una enfermedad que cursa con afectación muscular". Número de Registro: En proceso – 201230771. Propietario: Universidad Autónoma de Madrid-CIBERER..

Tesis doctorales / Doctoral theses

Imke M. Willers (2011). "Molecular mechanisms controlling the translation of the mRNA encoding the human catalytic β -subunit of mitochondrial H^+ -ATP synthase in cancer and development". Universidad Autónoma de Madrid. Directores: José M. Cuezva and Álvaro D. Ortega.

Inmaculada Martínez-Reyes (2012). "Mecanismos y vías de señalización implicados en la reprogramación metabólica en cáncer de colon". Universidad Autónoma de Madrid. Director: José M. Cuezva.

Otras actividades / Other activities

- Del grupo de investigación:

(i) Unidad 713 del CIBERER, en el Área de Patología Mitocondrial del CIBER de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III;

(ii) Grupo "Metabolismo Energético Traslacional" en el Área de Cáncer del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12) y

(iii) Formamos parte y coordinamos el Consorcio MITOLAB de la Comunidad de Madrid.

- J.M. Cuezva, (2011) ha sido Presidente del panel de evaluación "Biología Molecular y Celular" de la Comisión Nacional de Evaluación de la Actividad Investigadora (CNEAI).

- El grupo ha desarrollado recientemente el Servicio PROTEOmAb (2012) dirigido a la identificación y cuantificación de nuevos marcadores moleculares de enfermedad y/o a la respuesta a terapia, basado en tecnología de "Microarrays de Proteínas de Fase Reversa". Con este Servicio se pretende ayudar a la comunidad científica y/o clínica en la evaluación y traslación de marcadores del metabolismo energético.

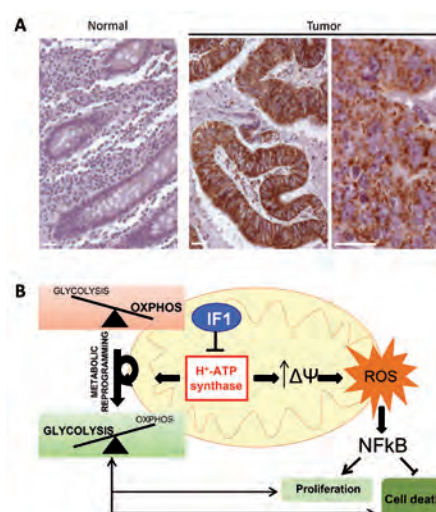


Figura 2. A, IF1 está sobreexpresado en cáncer de colon. B, IF1 inhibe la H^+ -ATP sintasa y media la reprogramación metabólica y la respuesta adaptativa celular dependiente de ROS.

Figure 2. A, IF1 is highly over-expressed in colon cancer. B, The inhibition of the H^+ -ATP synthase by IF1 triggers metabolic reprogramming to aerobic glycolysis and a ROS-mediated adaptive cellular response.

Síntesis de proteínas y su regulación en eucariontes

Protein synthesis and its regulation in eukaryotes



Jefe de Línea / Group Leader:
César de Haro Castella

Personal Científico /
Scientific Staff:
Juan José Berlanga Chiquero

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Isabela Alonso González
(hasta Abril 2011)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ruth Martín Martín
Javier del Pino García

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
José Alcalde García

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Lucía Morales Rodríguez
Miguel Herrero Baena
Juan Manuel Muñoz Peña
Nazareth Aparicio Antón
José Luis Jiménez Muñoz
(Escuela Taller F.S.O.)

Resumen de investigación

En respuesta a distintas situaciones de estrés, incluidas infección viral, falta de nutrientes y radiación ultravioleta, la fosforilación transitoria de la subunidad α del factor de iniciación de la traducción 2 (eIF2 α) reduce la síntesis global de proteínas, atenuando el gasto energético y facilitando la reprogramación de la expresión génica para remediar el daño. Así, la fosforilación de eIF2 α mediante la activación de una de las cuatro eIF2 α quinasas (HRI, PKR, PERK y GCN2) estimula la traducción de ATF4, activador transcripcional de genes implicados en la respuesta integrada al estrés. Nuestro interés se ha centrado en estas líneas:

1) Caracterización funcional del efecto antiviral de GCN2: i) GCN2 tiene efecto antiviral frente al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) y es degradado durante la infección viral; ii) el RNA de HIV-1 activa GCN2, promoviendo la inhibición de la traducción del RNA viral, y la proteasa de HIV-1 degrada GCN2 para contrarrestar su efecto antiviral.

2) Respuesta diferencial de las eIF2 α quinasas de *Schizosaccharomyces pombe* (Gcn2, Hri1 y Hri2) a distintas situaciones de estrés: i) las eIF2 α quinasas de *S. pombe* responden de forma diferenciada a la falta de nutrientes y están implicadas en la regulación del ciclo celular. Así, la ruta de señalización de las eIF2 α quinasas modula la parada del ciclo celular en la fase G1 y la capacidad de supervivencia y de apareamiento de las células en ausencia de nitrógeno.

Nuestro propósito es profundizar en el conocimiento de: i) los mecanismos moleculares de activación de las eIF2 α quinasas de mamífero, identificando nuevas proteínas que modulan su actividad; ii) el papel de las eIF2 α quinasas de *S. pombe* en la regulación del ciclo celular, así como en el desarrollo y viabilidad celular. Además, nuestro objetivo final es tratar de utilizar GCN2 como diana terapéutica frente al virus HIV-1.

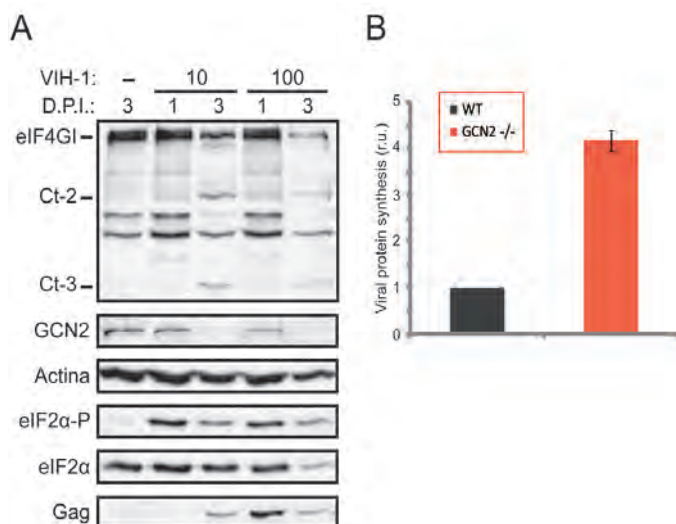


Figura 1. GCN2 inhibe la síntesis de proteínas del VIH-1 y es degradado durante la infección viral. (A) Durante la infección de VIH-1 se produce un aumento en la fosforilación de eIF2 α , posiblemente debido a la activación de GCN2, que inhibiría la traducción del RNA viral. Posteriormente, la proteasa viral degrada a GCN2 para contrarrestar ese efecto negativo. (B) En células que carecen del gen de GCN2 aumenta significativamente la síntesis de proteínas del virus.

Figure 1. GCN2 inhibits HIV-1 protein synthesis and is proteolytically cleaved upon viral infection. (A) HIV-1 infection induces a marked increase of eIF2 α phosphorylation levels, probably due to GCN2 activation, promoting inhibition of viral RNA translation. (B) In cells devoid of GCN2 gen, viral protein synthesis is significantly increased.

Research summary

In response to different environmental stresses, including viral infection, nutrient deprivation, and ultraviolet light exposure, the transient phosphorylation of the α subunit of translation initiation factor 2 (eIF2 α) rapidly reduces global protein synthesis, which lowers energy expenditure and facilitates reprogramming of gene expression to remediate stress damage. Thus, the phosphorylation of eIF2 α through the activation of any of the four eIF2 α kinases of mammalian cells (HRI, PKR, PERK and GCN2) enhances translation of ATF4, a transcriptional activator of genes involved in the integrated stress response. Our recent work has been focused on these major lines:

1) Functional characterization of the antiviral effect of GCN2 in mammalian cells: i) GCN2 has antiviral effect against human immunodeficiency virus (HIV-1) and is cleaved upon viral infection; ii) HIV-1 RNA activates GCN2, leading to the inhibition of viral RNA translation, and HIV-1 protease cleaves GCN2 to overcome its antiviral effect.

2) Differential response of the eIF2 α kinases of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (Gcn2, Hri1 and Hri2) to distinct situations of cellular stress: i) the eIF2 α kinases of *S. pombe* respond differently to nutrient deprivation in the culture medium and they are involved in regulation of cell cycle. Thus, the eIF2 α kinase signaling pathway modulates G1 phase arrest, cell survival and mating under nitrogen starvation in *S. pombe*.

The major aim of our research group in the future would be to understand more deeply: i) the molecular mechanisms involved in the activation of mammalian eIF2 α kinases, by identifying novel proteins that interact with them modulating their activity; ii) the role of *S. pombe* eIF2 α kinases in the regulation of cell cycle as well as in development processes and cellular viability, after different types of stress. Also, our goal is to try to employ GCN2 or its modulators as target for antiviral therapy against HIV-1.

Publicaciones / Publications

Del Pino, J., Jiménez, J.J., Ventoso, I., Castelló, A., Muñoz-Fernández, M.A., de Haro, C. and Berlanga, J.J. (2012) GCN2 has inhibitory effect on human immunodeficiency virus-1 protein synthesis and is cleaved upon viral infection. *PLoS One*. 7, e47272

Tesis doctorales / Doctoral theses

Ruth Martín Martín (2012). Caracterización funcional de las eIF2 α quinasas de *Schizosaccharomyces pombe* en distintas situaciones de estrés. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: César de Haro y Juan José Berlanga.

Javier del Pino García (2012). Interacción funcional de la eIF2 α quinasa GCN2 con el virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Juan José Berlanga y César de Haro.

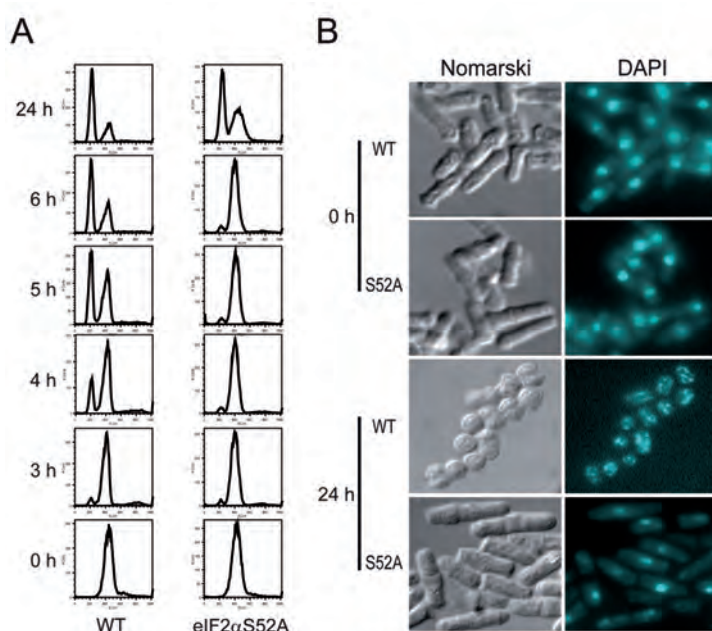
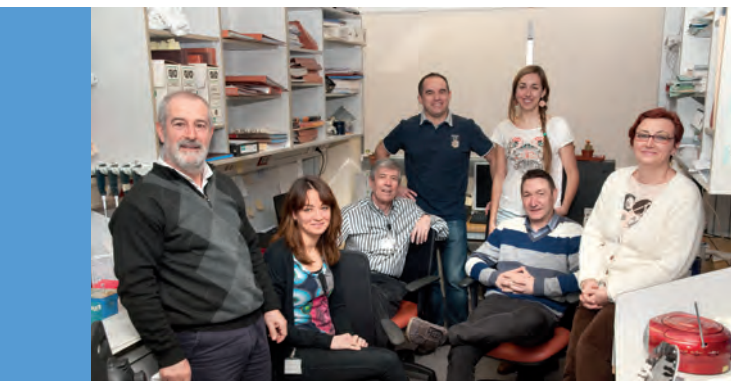


Figura 2. En *S. pombe* la fosforilación de eIF2 α es necesaria para una correcta parada del ciclo celular en la fase G1 en situaciones de ausencia de nitrógeno. (A) Mediante citometría de flujo, se observa que en ausencia de nitrógeno las células eIF2 α S52A, que expresan un eIF2 α no fosforilable, retrasan significativamente su parada en la fase G1 del ciclo celular. (B) En las micrografías ópticas (Nomarski) y fluorescentes (DAPI) se observa que, a diferencia de las células salvajes (WT) que pasan de G2-M a G1 dividiéndose y redondeándose, las células eIF2 α S52A continúan alargándose sin llegar a dividirse.

Figure 2. In *S. pombe* eIF2 α phosphorylation is required for proper G1 phase cell cycle arrest when growing in the absence of nitrogen. (A) Using flow cytometry, it is observed that in the absence of nitrogen eIF2 α S52A cells, which express a non-phosphorylatable eIF2 α , significantly retard arrest in G1 phase of the cell cycle. (B) The optical (Nomarski) and fluorescent (DAPI) micrographs show that, unlike the wild-type cells (WT) which move from G2-M to G1 by division and rounding, eIF2 α S52A cells continue to elongate without producing cell division.

Regulación post-transcripcional de la expresión génica en levaduras

Post-transcriptional regulation of gene expression in yeasts



Jefe de Línea / Group Leader:

Juan Pedro García Ballesta
Miguel Remacha Moreno

Personal Científico / Scientific Staff:

Miguel Ángel Rodríguez Gabriel

Postdoctorales /

Postdoctoral Fellows:

Antonio Jiménez Díaz
Rosario Francisco Velilla
Jael Sotelo Álvarez
Hendricka Camargo Martínez

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Hendricka Camargo Martínez
Ana María Matia González
Marina Portantier
Anne Marie Tessem

Técnico de Investigación /

Technical Assistance:

Mari Carmen Fernández Moyano

Estudiantes / Undergraduate Students:

Miriam Olombrada Sacristán
Álvaro Gil
Juan Toro
Lucía Cremades
Rebeca Martín
Alejandro Salgado Flores

Científicos visitantes / Visiting scientists:

Prof. D. Jameson, (Universidad de Hawai, USA)
Prof. Nilgun Tumer (Biotechnology Center, Rutgers University, New Jersey, USA)
Dra. Pilar Lillo (Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid)
Dr. Catherine Royer (Centre de Biochimie Structurale, CNRS, Montpellier, Francia)

Resumen de investigación

Se desarrollan tres líneas de investigación:

A.- Ensamblaje del tallo ribosómico (TR) de *Saccharomyces cerevisiae* (responsable J. P. García Ballesta). Conocer el mecanismo de ensamblaje del TR es un paso necesario para comprender su función reguladora de la traducción. Se están utilizando técnicas de espectroscopia de cros-correlación de fluorescencia (FCCS) y FRET así como la expresión de modificaciones en la proteína P0, elemento central del TR con este propósito. Los datos indican la existencia de al menos dos mecanismos alternativos de ensamblaje del TR, uno citoplasmático y otro nuclear, que pueden generar heterogeneidad ribosómica celular la cual es un elemento importante en el mecanismo de regulación de la traducción previamente propuesto por nuestro laboratorio.

B.- Las proteínas P y la función mitocondrial (responsable M. Remacha). En ausencia de proteínas P1/P2, las levaduras generan espontáneamente células petite, incapaces de llevar a cabo un metabolismo respiratorio. Con diferencias entre fondos genéticos, en el SK1 este porcentaje llega a alcanzar el 100%, lo que nos ha permitido estudiar a nivel molecular la relación entre las proteínas citoplasmáticas P1/P2 y la actividad mitocondrial.

C.- Responsable M. A. Rodríguez Gabriel) Utilizamos la levadura *Schizosaccharomyces pombe* como organismos modelo en el estudio de la respuesta a estrés y la transducción de señales en células eucarióticas. Estamos interesados en los mecanismos de transducción de señales y regulación postranscripcional de la expresión génica que siguen a los estímulos ambientales. Nuestra investigación se centra en el estudio de MAPKs y proteínas de unión a RNA, tratando de elucidar las rutas bioquímicas que permiten conseguir la especificidad fisiológica a la célula. También hemos avanzado en el conocimiento de cómo la levadura es capaz de responder a distintas formas de arsénico inorgánico y qué mecanismos bioquímicos pone en marcha en respuesta a este elemento tóxico.

Figura 1. Localización de la proteína P0 del tallo ribosómico en el núcleo de la célula de *S. cerevisiae* mediante la técnica N&B de espectroscopia de cros-correlación de fluorescencia y microscopía de dos fotones. A.- Células de *S. cerevisiae* expresando P0 marcada con proteína mCherry (rojo) y el factor nuclear de ensamblaje ribosómico Nop7 marcado con GFP (verde). B.- Zonas de cros-correlación positiva (azul) y cros-correlación negativa (rojo/amarillo) de las dos proteínas limitadas al núcleo celular. La cros-correlación negativa es debida a la existencia de FRET, comprobada independientemente.

Trabajo realizado en colaboración con la Dra. C. Royer (Centre de Biochimie Structurale, CNRS, Montpellier, Francia) y la Dra. P. Lillo (Instituto Rocasolano, CSIC, Madrid)

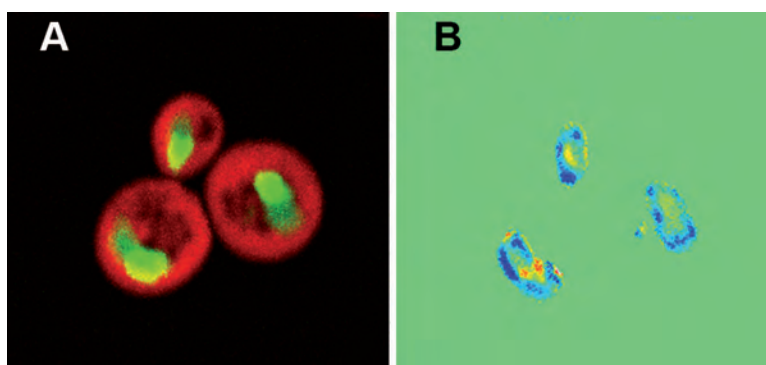


Figure 1. Location of the ribosomal stalk protein P0 in cellular nucleus of *S. cerevisiae* cells using Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy (N&B method) and two-photons microscopy. A.- *S. cerevisiae* cells expressing mCherry-tagged P0 (red) and the GFP-tagged assembly factor Nop7 (green). B.- Zones showing positive (blue) and negative (red/yellow) cross-correlation demonstrate the presence of both protein in the same particles. Negative cross-correlation is due to FRET, which was confirmed separately.

Work performed in collaboration with Dr. C. Royer (Centre de Biochimie Structurale, CNRS, Montpellier, Francia) and Dr. P. Lillo (Instituto Rocasolano, CSIC, Madrid).

Research summary

Three lines of research are being developed:

A.- *Assembly of the Saccharomyces cerevisiae ribosomal stalk (lead by J.P. García Ballesta):* Elucidating the ribosomal stalk (TR) assembly mechanism is a necessary step to understand its regulatory role in translation. We are using fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) and FRET and also the expression of modified derivatives of protein P0, the scaffold component of the TR for this purpose. The data show the existence of at least two alternative TR assembly mechanisms, one is cytoplasmic and the other nuclear. This duplicity may generate cellular ribosome heterogeneity, which is an important element in the translation regulation mechanism previously proposed by our laboratory.

B.- *The P proteins and the mitochondrial function (lead by M. Remacha).* In the absence of P1/P2, yeast cultures do spontaneously generate petite cells, unable to grow under respiratory conditions. With differences among different backgrounds, in SK1 the percentage of petite is close to 100%. After preparation of conditional mutants we have studied, at a molecular level, which are the relationships between the cytoplasmic P1/P2 proteins and the mitochondrial activity.

C.- *Stress response (lead by M.A. Rodríguez Gabriel).* We are interested in studying the mechanisms of signal transduction and posttranscriptional regulation of gene expression in response to environmental stimuli. For that purpose, we use the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a model organism. Our research is focused in the study of MAPKs and RNA binding proteins, and how they can achieve physiological specificity in response to different types of stress. We have also advanced in the knowledge of how yeast can respond to different forms of inorganic arsenic and the biochemical mechanisms triggered in response to this element.

Publicaciones / Publications

H. Camargo, G. Nussbaumer, D. Abia, V. Briceño, M. Remacha and J. P. G. Ballesta (2011) The amino terminal end determines the stability and assembling capacity of eukaryotic ribosomal stalk proteins P1 and P2. *Nucleic Acids Res* **39**, 3735-3743.

Chiou, X-P Li, M. Remacha, J. P. G. Ballesta and N. Tumer (2011) Shiga toxin 1 is more dependent on the P proteins of the ribosomal stalk for depurination activity than Shiga toxin 2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1792-1801.

Ballesta, J.P.G. Ribosome (2011) Encyclopedia of Astrobiology, Editor: Gargaud, M., Amils, R., Cernicharo, J., Cleaves, H.J., Irvine, W.M., Pinti, D.L., and Viso, M. Vol 1, 1456-1457.

Matia-González, A.M. and Rodríguez-Gabriel, M.A. (2011). Slr2 MAPK pathway is essential for cell integrity in the presence of arsenate. *Yeast* **28**, 9-17.

Cádernas, D., Revuelta-Cervantes, J., Jimenez-Diaz, A. Camargo, H., Remacha, M. and Ballesta, J.P.G. (2012) P1 and P2 protein heterodimer binding to the P0 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is relatively non-specific and a source of ribosomal heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4520-4529.

May, K.L., Li, X-P., Martinez-Azorin, F., Ballesta, J.P.G., Grela, P., Tchorzewski, M. and Tumer, N. The P1/P2 proteins of human ribosomal stalk are required for ribosome binding and depurination by ricin in human cells. *FEBS J.* **279**, 3925-3936.

García-Santamarina, S., Boronat, S., Calvo, I.A., Rodríguez-Gabriel, M., Ayté, J., Molina, H. and Hidalgo, E. (2012) Is Oxidized Thioredoxin a Major Trigger for Cysteine Oxidation? Clues from a Redox Proteomics Approach. *Antioxid Redox Signal.* Dec 10 (in press).

Salgado, A., López-Serrano Oliver, A., Matia-González, A.M., Sotelo, J., Zarco-Fernández, S., Muñoz-Olivas, R., Cámara, C. and Rodríguez-Gabriel, M.A. (2012) Response to arsenate treatment in *Schizosaccharomyces pombe* and the role of its arsenate reductase activity. *PLoS One* **7**, e43208.

Matia-González, A.M., Sotelo, J. and Rodríguez-Gabriel, M.A. (2012) The RNA binding protein Csx1 promotes sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **7**(1):e30067.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Hendricka Camargo Martínez (2011). Las proteínas P, la esporulación y la respiración en *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Miguel Remacha y Juan Pedro García Ballesta.

Ana María Matia González (2011). "Role of Upf1 and Csx1 in posttranscriptional regulation of gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*" UCM. Director: Miguel Ángel Rodríguez Gabriel.

Organización funcional del genoma de mamíferos

Functional organization of the mammalian genome

Jefe de Línea / *Group Leader:*
María Gómez Vicentefranqueira

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ricardo Fradique de Almeida
Rodrigo Lombraña Pascual
Sofía Matos Madeira
Isabel Revuelta García

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
Gonzalo Herranz Gómez
David Romera García

Resumen de investigación

El interés de nuestro laboratorio es descifrar la información regulatoria del genoma de los mamíferos y, en concreto, entender la coordinación entre la replicación y la transcripción necesaria para responder a cambios ambientales o a determinantes de identidad celular. Para ello combinamos aproximaciones de biología molecular de alta resolución con aproximaciones genómicas dirigidas a caracterizar los sitios de inicio de la replicación y sus requerimientos epigenéticos.

Las células que se están dividiendo activamente deben duplicar de modo preciso su contenido en DNA antes de la división celular. En las células de mamíferos la duplicación del genoma comienza desde unos 20,000-50,000 sitios de iniciación por ciclo celular, existiendo grandes diferencias de frecuencia de uso entre ellos. A pesar de su importancia en la regulación y en la estabilidad del genoma, se desconoce cómo se especifican los orígenes de replicación y qué determina su eficiencia de activación en una población de células. Las unidades básicas de la cromatina, los nucleosomas, son uno de los candidatos más probables para modular la eficiencia de activación de los orígenes ya que regulan el acceso de los complejos proteicos al DNA. Hemos investigado esta posibilidad mediante análisis de alta resolución tanto del posicionamiento de nucleosomas como de los sitios de inicio de la replicación en un grupo de orígenes de replicación que se activan con distintas eficiencias. Hemos encontrado que en células de mamíferos los sitios de inicio de la replicación se localizan en regiones de alta ocupación nucleosomal y que los patrones de iniciación de la replicación reflejan el posicionamiento de los nucleosomas en los orígenes. Hemos llegado a esta conclusión mediante análisis detallados en orígenes individuales y mediante la modulación de la arquitectura nucleosomal en orígenes endógenos o en un transgen en un sistema heterólogo.

Estos resultados relacionan la iniciación de la replicación con el posicionamiento de los nucleosomas y ayudan a explicar la naturaleza flexible y degenerada de los orígenes de replicación, así como su habilidad para acomodarse a un epigenoma dinámico.

Research summary

The long-term interest of our laboratory is decoding the regulatory information of the mammalian genome, focusing on the coordination between transcription and replication that is needed to respond to either environmental changes or determinants of cell identity. Within this context, we combine detailed molecular biology approaches directed to characterise the sites of DNA replication initiation in human and mouse cells and their epigenetic requirements, with genome-wide approaches aimed to reveal the complexity of the organization of both basic genomic processes.

Actively dividing cells should accurately duplicate their DNA content before cell division. In mammalian cells genome duplication starts from 20,000-50,000 initiation sites per cell cycle, with marked differences in the frequency of usage between them. Despite of their importance in genome regulation, it remains a mystery how replication origins are specified and what determines their firing efficiency in a population of cells. The basic units of chromatin, the nucleosomes, are likely candidates to influence origin efficiency as they regulate the access of protein complexes to DNA. We investigated this possibility by performing a high-resolution analysis of nucleosome positioning and replication initiation sites at a subset of origins of a range of firing efficiencies. We found that in mammalian cells DNA synthesis start sites occur at genomic sites of high nucleosome occupancy and that initiation patterns mirror nucleosome positioning. We conclude this by detailed analysis at individual origins of diverse nucleosome configuration and by modulating nucleosome architecture either at an endogenous replication origin or at a transgene in a heterologous system.

Our findings link replication initiation with nucleosome positioning and help explaining the degenerated and flexible nature of DNA replication origins, as well as their ability to accommodate to a dynamic epigenome.

Publicaciones / Publications

Sequeira-Mendes, J. and Gómez, M. (2012). On the opportunistic nature of transcription and replication initiation in the metazoan genome. *Bioessays* **34**: 119-125.

Otras actividades / Other activities

TRABAJOS DE MÁSTER / MASTER THESES:

Isabel Revuelta García (2011). Replication initiation and re-replication activity of a transgenic hLaminB2 replication origin. Universidad Autónoma de Madrid.

Director: María Gómez

Ricardo Fradique de Almeida (2011). Link between origin efficiency and nucleosome positioning in mouse ES cells. Universidade do Minho, Portugal.

Director: María Gómez

Sofia Matos Madeira (2011). Influence of CpG island methylation status and histone modification marks in the firing efficiency of DNA replication origins in pluripotent cells. Universidade do Minho, Portugal.

Director: María Gómez

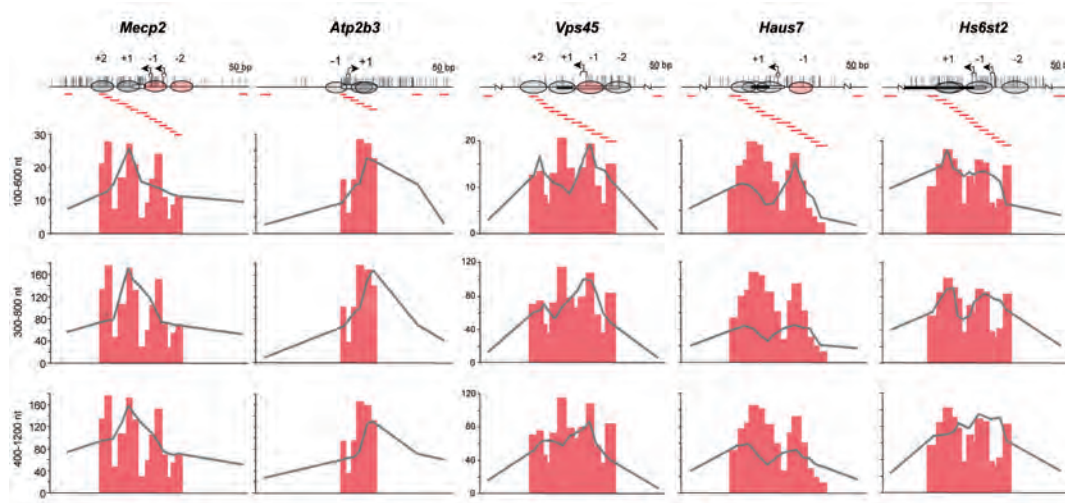
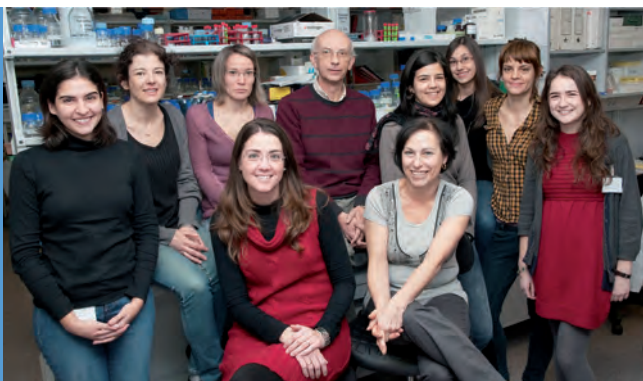


Figura 1. Perfiles de iniciación de la replicación (líneas grises) y organización nucleosomal (histogramas rojos) en orígenes de replicación de DNA asociados con promotores de genes activos.

Figure 1. Replication initiation profiles (grey lines) and nucleosomal organization (red histograms) at efficient DNA replication origins associated with active gene promoters.

Replicación del DNA, división celular y cromatina

DNA replication, cell division and chromatin



Jefe de Línea / *Group Leader*:
Crisanto Gutiérrez Armenta

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Marta Barcala Rodríguez
Celina Costas Iglesias
Bénédicte Desvoves
Joana Sequeira-Mendes
Maria Fernández Marcos
Irene Aragüez Rey
Elena Caro Bernat

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Nuria Mauri Panadero
Sofía Otero Pérez
Zaida Vergara Pardillo

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
María Victoria Mora-Gil Cobo

Estudiantes / *Undergraduate Students*:
Sergio Muñoz Sánchez
Alexandra Martín

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Adriana Garay
(UNAM, México)

Resumen de investigación

La emergencia de los organismos multicelulares requirió la adquisición de nuevos mecanismos para coordinar la división celular y la diferenciación. Nuestro interés se centra en entender cómo se ha establecido dicha coordinación durante el desarrollo estudiando la replicación del DNA y el control de la expresión génica. Utilizamos la planta *Arabidopsis thaliana* que permite realizar abordajes moleculares, celulares, genéticos y genómicos. Por ello, tanto conceptual como técnicamente, *Arabidopsis* es un modelo muy apropiado a nivel de organismo para responder preguntas fundamentales sobre ciclo celular y replicación del genoma en organismos multicelulares.

Uno de nuestros objetivos ha sido identificar los orígenes de replicación a nivel de genoma completo (originoma) y las marcas epigenéticas asociadas en células de *Arabidopsis* en cultivo. Hemos observado que los orígenes tienden a localizarse en la mitad 5' de los genes, un hecho confirmado después en células animales, y a estar enriquecidos en marcas activadoras e histonas H2A.Z y H3.3. Hemos desarrollado protocolos para el estudio de orígenes de replicación en el organismo completo lo que nos está permitiendo identificar factores y condiciones que influyen en su especificación y su uso, por ejemplo, hormonales, de desarrollo o ambientales.

Las chaperonas de histona facilitan la asociación de histonas con el DNA en procesos dependientes (CAF-1 para la H3.1) o no (HIRA para la H3.3) de la replicación del DNA. Tras obtener el mapa genómico de ambas estamos expandiendo nuestro estudio a varios mutantes de chaperonas. Además, estamos interesados en identificar nuevas funciones de la proteína retinoblastoma y de varios factores de transcripción en la coordinación de replicación y división celular a través de nuevos mecanismos de control de la expresión génica.

A largo plazo, nuestro interés es entender las relaciones entre división celular, cromatina y diferenciación durante el desarrollo de *Arabidopsis* con especial énfasis en la iniciación de la replicación, su regulación en el organismo y las implicaciones de nuevos factores celulares.

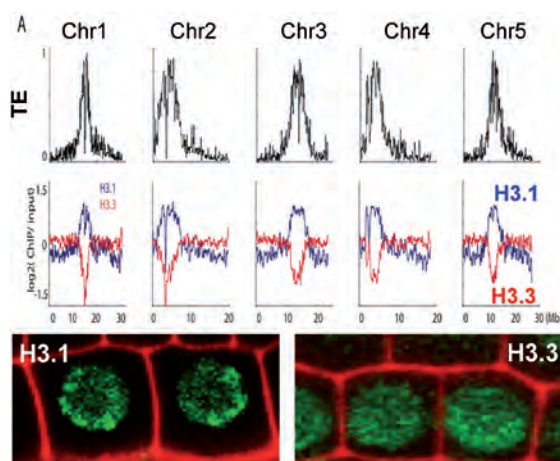


Figura 1. Distribución (arriba) y visualización (abajo) de histona H3.1 y H3.3 en *Arabidopsis*.

Figure 1. Distribution (top) and visualization (bottom) of histone H3.1 and H3.3 in *Arabidopsis*.

Research summary

*Emergence of multicellular organisms required novel structures and mechanisms to coordinate cell division, acquisition of cell fates and cell differentiation. We are interested in understanding how this coordination is established by studying cell division, DNA replication and gene expression control, as well as the implications of epigenetics. Organogenesis in plants, in contrast to animals, is a postembryonic continuous process that relies on proliferation and endoreplication cycles. Thus, we use *Arabidopsis thaliana* because both conceptually and technically, is a powerful model to tackle these fundamental questions at the organismal level using molecular, cellular, genetic and genomic approaches.*

*One of our goals has been the genome-wide identification of replication origins (the originome) and their associated epigenetic marks in cultured *Arabidopsis* cells. We found that most origins colocalize with the 5' half of genes and are enriched in nucleosomes, histone H2A.Z and H3.3 variants. Next, we have developed approaches to study origins in the whole organism to identify factors and/or conditions, beyond the cellular level, that influence genome replication control, e.g. hormonal, developmental or environmental signals.*

Histone chaperones facilitate association of histones with DNA in a DNA replication- dependent (CAF-1) or –independent (HIRA) manner depositing H3.1 or H3.3 variants, respectively. After obtaining the genome-wide map of H3.1 and H3.3, we are expanding these studies to various chaperone mutants to determine their relevance in gene expression and genome replication. The coordination of genome replication and expression is crucial for cell proliferation and organ growth. We aim to identify novel roles of the retinoblastoma protein and various transcription factors in controlling cell fate through unknown mechanisms of gene expression control.

*Our long-term interest is to understand the crosstalk of cell division, chromatin and differentiation during *Arabidopsis* development with a special focus in understanding initiation of DNA replication, its regulation in a whole organism and the implications of the novel cellular factors that we are identifying.*

Publicaciones / Publications

Costas, C., Sanchez, M.P., Stroud, H., Yu, Y., Oliveros, J.C., Feng, S., Benguria, A., López-Vidriero, I., Zhang, X., Solano, R., Jacobsen, S.E., and Gutierrez, C. (2011) Genome-wide mapping of *Arabidopsis* origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 395-400.

Lario, L., Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C., Casati, P., and Spampinato, C. (2011) Regulation of plant MSH2 and MSH6 genes in the UV-B induced DNA damage response. *J. Exp. Bot.* **62**, 2925-2937.

Costas, C., Desvoves, B., and Gutierrez, C. (2011) A chromatin perspective of cell cycle progression. *Biochim. Biophys. Acta* **1809**, 379-387.

Costas, C., Sánchez, M.P., Sequeira-Mendes, J., and Gutierrez, C. (2011) Progress in understanding DNA replication control. *Plant Sci.* **181**, 203-209.

Sanmartin, M., Sauer, M., Muñoz, A., Zouhar, J., Ordóñez, A., van de Ven, W.T.G., Caro, E., Sanchez, M.P., Raikhel, N., Gutierrez, C., Sanchez-Serrano, J.J., and Rojo, E. (2011) A molecular switch for initiating cell differentiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **21**, 999-1008.

Stroud, H., Otero, S., Desvoves, B., Ramirez-Parra, E., Jacobsen, S.E., and Gutierrez, C. (2012) Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 5370-5375.

Sánchez, M.P., Costas, C., Sequeira-Mendes, J., and Gutierrez, C. (2012) DNA replication control in plants. In: DNA replication, 3rd Edition, S.D. Bell, M. Mechali, M.L. DePamphilis, Eds. pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4:a01014.

Manzano, C., Ramirez-Parra, E., Casimiro, I., Otero, S., Desvoves, B., De Rybel, B., Beeckman, T., Casero, P., Gutierrez, C., and del Pozo, J.C. (2012) Auxin and epigenetic regulation of SKP2B, an F-box that represses lateral root formation. *Plant Physiol.* **160**, 749-762.

Caro, E., Desvoves, B., and Gutierrez, C. (2012) GTL1 keeps cell growth and nuclear ploidy under control. *EMBO J.* **31**, 4483-4485.

Otras actividades / Other activities

Editor: Plant J.

Editorial Board: EMBO J., EMBO reports, Front. Plant Genet. Genom.

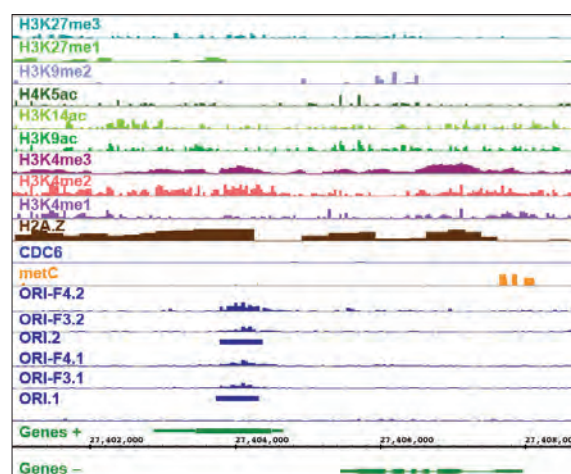


Figure 2. Ejemplo de las características epigenómicas de un origen de replicación.

Figure 2. Example of epigenomic properties of a DNA replication origin.

Redes reguladoras de la expresión génica

Gene expression regulatory networks



Jefe de Línea / *Group Leader:*
José María Izquierdo Juárez

Personal Científico / *Scientific Staff:*
José Manuel Sierra Pérez

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Carmen Sánchez Jiménez
Isabel Martínez Carrascoso
(hasta marzo de 2012)
Mario Núñez Díaz
(hasta julio de 2012)

Resumen de investigación

La regulación de la expresión génica en eucariotas superiores es un proceso multifásico que implica varios eventos complejos, tales como la transcripción, el procesamiento, la traducción y el recambio de los RNAs y de las proteínas. Actualmente está bien establecido que cada paso de este circuito informativo se modula por la acción de RNAs y/o proteínas reguladoras. Hasta ahora, cada paso ha sido estudiado de manera individual, pero poco se sabe sobre cómo el efecto combinado de todos los eventos reguladores se coordinan por la acción de proteínas multifuncionales. Por lo tanto, la cuestión fundamental de cómo la información genómica y transcriptómica se procesa en diferentes niveles reguladores en respuesta a cambios dinámicos y tensiones ambientales para obtener la diversidad proteómica específica ha quedado, por lo tanto, sin respuesta.

Las proteínas *T-cell intracellular antigen 1* (TIA1) y *TIA1 related/like* (TIAR/TIAL1) son moduladores multifuncionales de las diferentes capas que constituyen el flujo de la expresión génica y, por tanto, unos buenos candidatos para llevar a cabo estos estudios. En el núcleo, estas proteínas interaccionan tanto con el DNA como con la RNA polimerasa II regulando las velocidades de transcripción. Las proteínas TIA también funcionan como moduladores del procesamiento de los pre-mRNAs promoviendo el reclutamiento de la ribonucleoproteína nuclear U1 snRNP para cortar y empalmar exones alternativos y constitutivos. En el citoplasma, estas proteínas tienen la doble función de regular la estabilidad y/o traducción de los mRNAs implicados en respuestas celulares apoptóticas e inflamatorias. Desde un punto de vista (pato)-fisiológico, estos reguladores han sido implicados en el desarrollo de procesos biológicos complejos como son la apoptosis, la inflamación, las infecciones mediadas por virus, el estrés ambiental, el desarrollo embrionario o la tumorigénesis. Sin embargo, sus efectos sobre la proliferación, la diferenciación y el crecimiento celular necesitan ser esclarecidos.

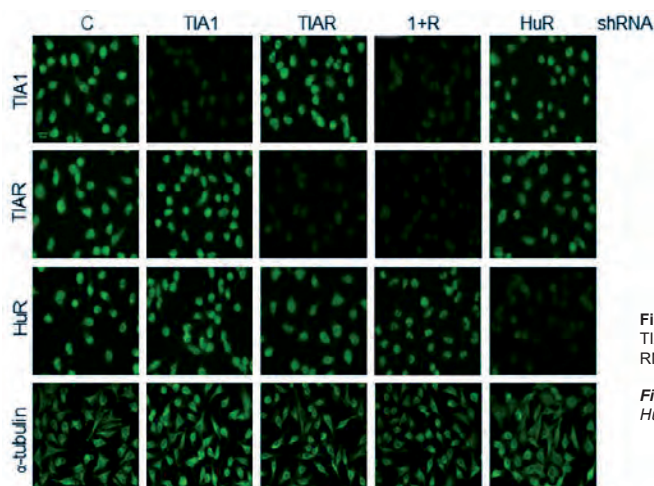


Figura 1. Reducción de la expresión de las proteínas TIA1, TIAR y HuR en células HeLa mediante técnicas de RNA interferente.

Figure 1. RNAi-mediated knockdown on TIA1, TIAR and HuR proteins in HeLa cells.

Research summary

Gene expression in higher eukaryotes is a multilayer process involving several complex processes such as the transcription, splicing, translation and turnover of RNAs and proteins. It is now well-established that each step of this informative circuit is modulated by gene-regulatory events. So far each individual process has been strongly studied, but little is known about how the combined effect of all regulatory events shapes gene expression by multifunctional proteins. Thus, the fundamental question of how genomic and transcriptomic information is processed at different levels in response to dynamic regulatory changes and environmental stresses to obtain specific proteome diversity have therefore remained unanswered.

The T-cell intracellular antigen 1 (TIA1) and the TIA1-related (TIAR) proteins are multifunctional modulators at different layers of the gene expression regulatory flux and a good candidates to carry out these studies. They can interact with DNA and RNA polymerase II to modulate the transcriptional rates of genes that encode functional proteins and RNAs. TIA proteins are also splicing factors that promote the U1 snRNP recruitment to splice alternative and constitutive exons. In the cytoplasm, these proteins have dual roles in promoting stability and/or repressing translation of mRNAs involved in apoptotic and inflammatory pathways. From a (patho-)physiological viewpoint, these regulators have been involved in the development of main biological processes and complex cellular responses such as apoptosis, inflammation, virus-mediated infections, environmental stress, embryonic development or tumorigenesis. Although the roles of TIA proteins in key processes as for example inflammation and the cell response to stress are well established, its effects on cell proliferation, differentiation and growth remain elusive.

Publicaciones / Publications

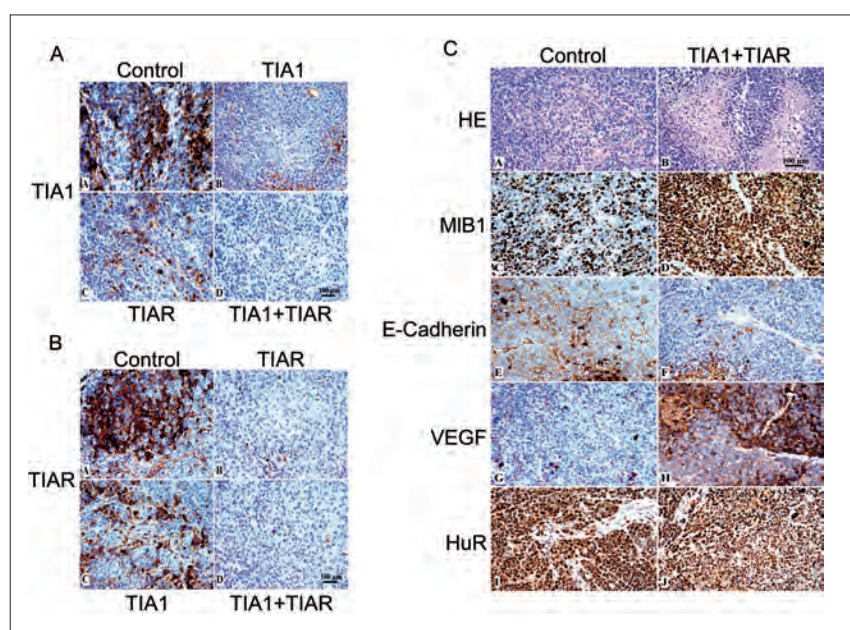
Izquierdo, J. M., Alcalde, J., Carrascoso, I., Reyes, R., and Ludeña, M.D. (2011) Knockdown of T-cell intracellular antigens triggers cell proliferation, invasion and tumor growth. *Biochem. J.* **435**, 337-344.

Corrionero, A., Raker, V.A., Izquierdo, J. M., and Valcárcel, J. (2011) Strict 3' splice site sequence requirements for U2 snRNP recruitment after U2AF binding underlie a genetic defect leading to autoimmune disease. *RNA*. **17**, 401-411.

Álvarez, E., Castelló, A., Carrasco, L., and Izquierdo, J. M. (2011) Alternative splicing, a new target to block cellular gene expression by poliovirus 2A protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 142-147.

Figura 2. Caracterización inmunohistoquímica de los xenotumores derivados de células HeLa con expresión disminuida de las proteínas TIA1 y/o TIAR.

Figure 2. Immunohistochemical characterization of xenograft tumors derived from TIA1- and/or TIAR-depleted HeLa cells.



Iniciación interna de la traducción en mRNAs eucarióticos

Internal initiation of translation in eukaryotic mRNAs

Jefe de Línea / *Group Leader*:
Encarnación Martínez-Salas

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Noemi Fernandez
David Piñeiro
Gloria Lozano
Rosario Francisco

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ted Fajardo
Alfonso Galán
Javier Fernández

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Jorge Ramajo Alonso

Estudiantes / *Undergraduate Students*:
Lisa Buddrus
Joseph Montebello

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
María Inés Gismondi
(INTA, Buenos Aires, Argentina)

Resumen de investigación

Las regiones no codificantes del mRNA contienen motivos reguladores que juegan un papel clave en situaciones de estrés celular. De hecho, el descubrimiento de nuevos mecanismos de control de la traducción mediante elementos estructurales del mRNA, proteínas de interacción con RNA o microRNAs ha revolucionado el campo de la regulación génica con implicaciones en la salud y la enfermedad. El interés de nuestro grupo consiste en entender el proceso de iniciación de la traducción dirigido por sitios de entrada interna del ribosoma (IRES) y, específicamente, en dilucidar el mecanismo por el cual elementos IRES de RNA virales dirigen el inicio de la traducción.

Los elementos IRES forman complejos ribonucleoproteicos en los que la estructura del RNA está íntimamente relacionada con su actividad. Hemos identificado elementos estructurales (Fig. 1), esenciales para la actividad IRES implicados en interacciones terciarias que proporcionan información para la construcción de modelos de RNA tridimensionales. En paralelo, hemos caracterizado proteínas que interaccionan con IRES virales que forman parte de redes de regulación génica. Gemin5 actúa como regulador negativo de la traducción, interaccionando con una región del IRES a través de su extremo C-terminal (Fig. 2). Gemin5 es proteolizada en células infectadas por FMDV por la proteasa L que reconoce una secuencia rica en aminoácidos básicos (Fig. 2). Este resultado permitió identificar nuevos factores sustrato de esta proteasa, como Daxx, implicada en control de transcripción, apoptosis y respuesta antiviral.

La definición de un motivo estructural mínimo con actividad IRES es esencial para poder hacer predicciones de IRES en mRNAs eucarióticos a escala genómica. El trabajo que tenemos en curso sobre la organización de IRES virales junto con la caracterización de la red de proteínas que modulan la iniciación de la traducción nos permitirá establecer las bases moleculares para predecir la presencia de elementos IRES en mRNAs celulares.

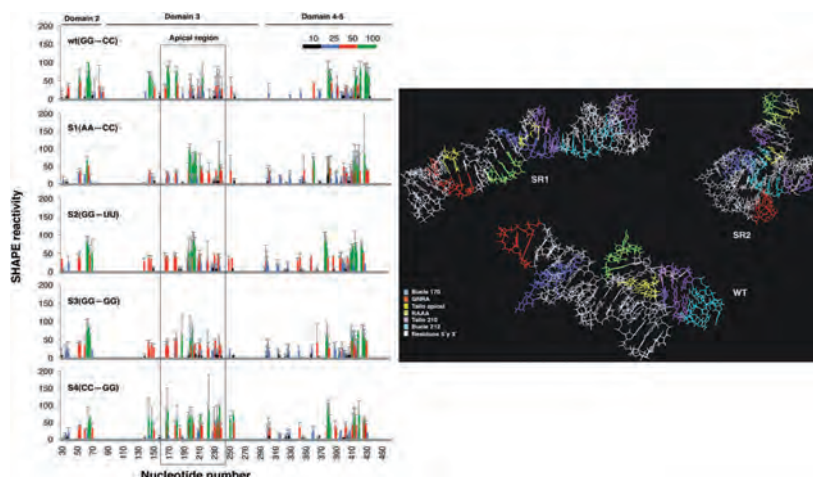


Figura 1. Análisis estructural de mutantes del IRES de FMDV vía SHAPE (izquierda). Modelo estructural del tallo apical del dominio 3 (derecha).

Figure 1. SHAPE structural analysis of FMDV mutant IRES elements (left). RNA structure model of the apical stem-loop of domain 3 (right).

Research summary

RNA regulatory motifs located in non-coding regions play crucial roles in gene expression control during cellular stress. The discovery of novel mechanisms of translation control by RNA structures, RNA-binding proteins and microRNAs have increased the potential for gene regulation, with key implications for health and disease. We are interested in understanding the process of internal initiation driven by viral Internal Ribosome Entry Site (IRES) elements.

To achieve its function, IRES elements assemble ribonucleoprotein complexes in which RNA structure and IRES function is tightly coupled. We have identified conserved structural elements required for viral IRES activity that determine distant interactions providing information about conformational constraints helpful to build RNA three-dimensional models (Fig. 1). In parallel, we have characterized novel IRES-interacting proteins that form part of regulatory networks of gene expression. Functional characterization of Gemin5 has shown a novel function for this protein as a negative regulator of translation. Gemin5 binds to a discrete region of the IRES through its C-terminal region (Fig. 2). Gemin5 is proteolyzed in FMDV infected cells by the action of the L protease; the cleavage site consists of a basic amino acid sequence (Fig. 2). This result allowed us to identify novel host factors that are substrate of this protease. This is the case of Daxx involved in transcription control, apoptosis and antiviral response.

Definition of the minimal structural motif that can build up an IRES element is essential to predict potential IRES elements at a genome-wide scale. Our current and near future work on viral IRES structural organization together with the functional characterization of the network of RNA-binding proteins that modulate translation initiation will allow us to be in a position to predict the presence of a functional IRES in cellular mRNAs.

Publicaciones / Publications

Fernández, N., Fernandez-Miragall, O., García-Sacristán, A., Ramajo, J., Bellora, N., Eyra, E., Briones, C. and Martínez-Salas, E. (2011) Structural basis for the function of the invariant apical stem in IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8572-8585.

Fernández, N., García-Sacristán, A., Ramajo, J., Briones, C. and Martínez-Salas, E. (2011) Structural analysis provides insights into the modular organization of picornavirus IRES. *Virology*, **409**, 251-261.

Piñeiro, D., Ramajo, J., Bradrick, S.B., and Martínez-Salas, E. (2012) Gemin5 proteolysis reveals a novel motif to identify L protease targets. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4942-4953.

Martínez-Salas, E., Piñeiro, D. and Fernandez, N. (2012) Riboproteomics approaches to understanding IRES elements. In: Dinman, J.D. (Ed) Biophysical Approaches to Translational Control of Gene Expression. *Biophysics for the Life Sciences* Vol. 1, Springer New York, pp. 103-118.

Martínez-Salas, E., Piñeiro, D. and Fernandez, N. (2012) Alternative mechanisms to initiate translation in eukaryotic mRNAs. *Comp Funct Genomics*. Special issue on Translational control across eukaryotes. G. Hernández, C. Proud, T. Preiss and A. Parsyan (Eds). 2012: 391546.

Fajardo, T., Jr., Rosas, M.F., Sobrino, S. and Martínez-Salas, E. (2012) Exploring IRES region accessibility by interference of foot-and-mouth disease virus infectivity. *PLoS One*, **7**(7): e41382.

Piñeiro, D. and Martínez-Salas, E. (2012) RNA structural elements of Hepatitis C virus controlling viral RNA translation. Implications for viral pathogenesis. *Viruses*, **4**, 2233-2250.

Piñeiro, D., Fernandez, N., Ramajo, J. and Martínez-Salas, E. (2013) Gemin5 promotes IRES interaction and translation control through its C-terminal region. *Nucleic Acids Res.* **41**:1017-1028.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Teodoro Jr. Fajardo Mallari (2011). Picornavirus IRES: accessibility and inhibition of viral gene expression. Universidad Autónoma de Madrid. Director: E. Martínez-Salas.

TRABAJOS DE MÁSTER / MASTER THESES:

Javier Fernández Chamorro (2012). Identification of the domain of Gemin5 responsible for translation control. Universidad Autónoma de Madrid. Director: E. Martínez-Salas y David Piñeiro.

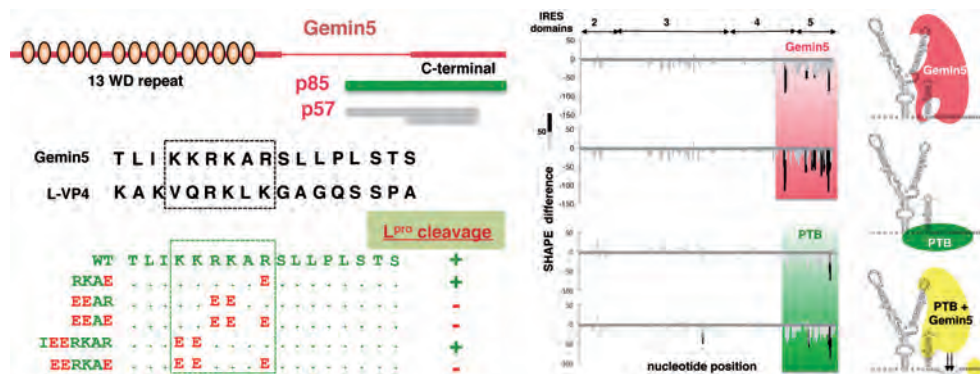
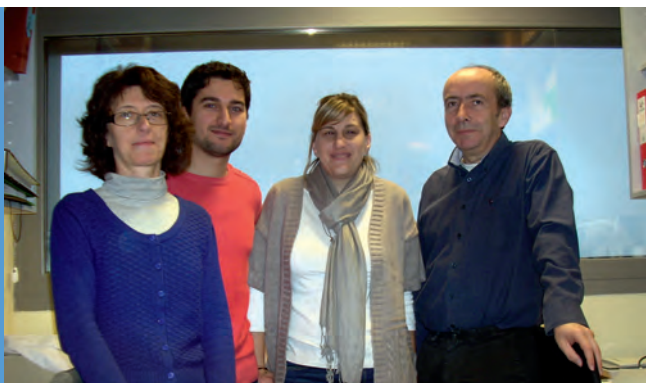


Figura 2. Proteólisis de la proteína Gemin 5 por la proteasa L de FMDV (izquierda). Determinación de los nucleótidos protegidos por Gemin5 y PTB en el IRES de FMDV (derecha).

Figure 2. Gemin5 proteolysis by the FMDV L protease (left). Gemin5 and PTB footprint on the FMDV IRES (right).

Regulación de la expresión génica en *Leishmania**Regulation of gene expression in Leishmania*

Jefe de Línea / Group Leader:
José María Requena Rolanía

Contratado Postdoctoral /
Postdoctoral Fellow:
Diana Martín Lorenzo
Esther Garde Contreras
(desde octubre, 2012)

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Virginia Franco Hidalgo

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Antonio Crespillo Alguacil

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Karolina Gajda
Yaneth Ledesma García
Kalaumari Mayoral
Leticia Olábarri Azagra

Científicos visitantes /
Visiting Scientist:
César Augusto Ramírez Segura
(Pontificia Universidad Javeriana,
Bogotá, Colombia)

Resumen de investigación

Una de las características más sorprendentes de *Leishmania* es que carece de una regulación de la expresión génica a nivel transcripcional. En estos organismos, la expresión génica es regulada por mecanismos postranscripcionales, actualmente poco conocidos. Por este motivo, estos microorganismos constituyen modelos muy adecuados para estudiar mecanismos de regulación postranscripcional. Además, estos parásitos unicelulares son patógenos importantes en humanos.

Nuestro grupo viene contribuyendo a la teoría de que la regulación génica postranscripcional en *Leishmania* es determinada por elementos localizados en las regiones 3' no traducidas (3'-UTRs) de los mRNAs. Estamos estudiando proteínas de unión a RNA (RBPs), como elementos clave en la regulación de la expresión génica. En concreto, nuestro campo de estudio son las RBPs de la familia PUF. Hasta 11 proteínas PUF están codificadas en *Leishmania*, y gran parte de la actividad investigadora del grupo se dirige a determinar los mRNAs blanco de cada una de estas proteínas. Las proteínas PUF interaccionan con secuencias localizadas en las 3'-UTRs de sus mRNAs blanco. Sin embargo, en las bases de datos del genoma de *Leishmania*, no existe información sobre las regiones 5'- y 3'-UTRs de los genes. Los avances en las tecnologías de secuenciación, actualmente permiten determinar el transcriptoma de un organismo de forma sencilla. Con este objetivo, en colaboración con la unidad de Genómica y Secuenciación Masiva del CBMSO, estamos reconstruyendo el transcriptoma de varias especies de *Leishmania* mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq). Esta información resulta clave para determinar cómo la regulación de la expresión génica tiene lugar en el tiempo y en el espacio durante la diferenciación del parásito, así como la identificación de los elementos reguladores en los mRNAs.

Por otro lado, como miembro de la red de Enfermedades Tropicales (ISCIII), nuestro grupo interviene en proyectos colaborativos dirigidos a la búsqueda de estrategias terapéuticas y de prevención de la leishmaniasis, una enfermedad que continua afectando a millones de personas en todo el mundo.

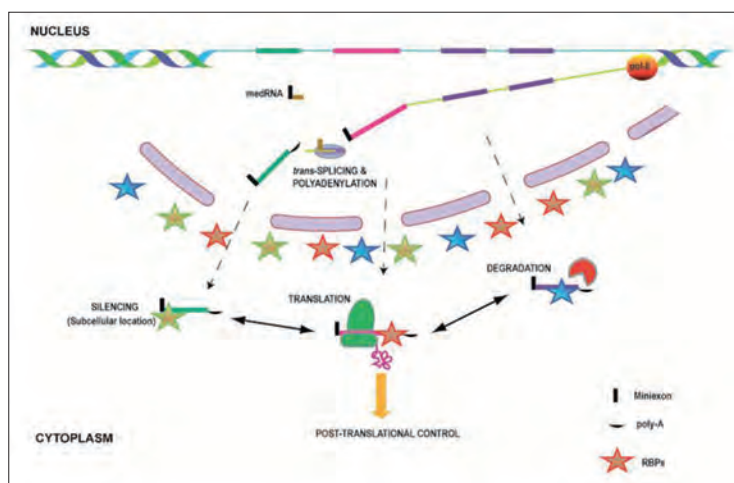


Figura 1. Visión general sobre la regulación de la expresión génica en *Leishmania* (Requena (2011) *Front Biosci* 17, 2069-2085).

Figure 1. Overview of the regulation of gene expression in *Leishmania* (Requena (2011) *Front Biosci* 17, 2069-2085).

Research summary

One of the most remarkable features of *Leishmania* is the almost complete absence of transcriptional regulation. In these organisms, gene expression is regulated by post-transcriptional mechanisms poorly understood at present. Therefore, these organisms are extremely attractive models for studying mechanisms of post-transcriptional regulation. In addition, these unicellular parasites are important pathogens for humans.

Studies from our group contributed (and continues contributing) to the general belief that post-transcriptional gene regulation frequently occurs through elements located in mRNA 3' untranslated regions (UTRs). Currently, we are studying RNA-binding proteins (RBPs), as key players in the regulation of gene expression. In particular, our objective is the study of RBPs belonging to the PUF family. Eleven different PUF proteins are encoded in *Leishmania*, and an important effort of our group is directed to determine RNAs that are bound to each one of these proteins. PUF proteins bind regulatory sequences located in the 3'UTRs of their target mRNAs. However, in *Leishmania* genome databases, genes lack annotated 5'- and 3'-UTRs. Recent advances in sequencing technology have created unprecedented opportunity to define transcriptomes. For this purpose, in collaboration with the Genomics and Massive Sequencing Unit at CBMSO, we are reconstructing the entire transcriptome of *Leishmania major* and other *Leishmania* species using deep RNA sequencing (RNA-Seq). Such information is central to determining the timing and regulation of gene expression in different developmental stages and the identification of functional elements in mRNAs.

On the other hand, as members of the Tropical Diseases network (ISCIII), our group is engaged in collaborative projects exploring new therapeutic and preventive strategies to control leishmaniasis, a disease that continues affecting millions of people worldwide.

Publicaciones / Publications

Ramírez, C., Puerta, C. and Requena, J.M. (2011). Evidence of RNA editing in *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Parasitol. Res.* **108**, 731-739.

Requena, J.M. (2011) Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. *Front. Biosci.* **16**, 2069-2085.

Nocua, P., Ramírez, C., Requena, J.M. and Puerta, C.J. (2011) Secuencia parcial del genoma del maxicirculo de *Leishmania braziliensis*, comparación con otros tripanosomátidos. *Universitas Scientiarum* **16**, 29-50.

Carrion, J., Folgueira, C., Soto, M., Fresno, M. and Requena, J.M. (2011) *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. *Parasites & Vectors* **4**, 150.

Ramírez, C.A., Requena, J.M. and Puerta, C.J. (2011) Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. *Parasites & Vectors* **4**, 166.

Ali, N., Mekuria, A.H., Requena, J.M. and Engwerda, C. (2012) Immunity to visceral leishmaniasis. *J. Trop. Med.* **2012**, 780809.

Requena, J.M., Chicharro, C., García, L., Parrado, R., Puerta, C.J. and Cañavate, C. (2012). Sequence analysis of the 3'-untranslated region of HSP70 (type I) genes in the genus *Leishmania*: its usefulness as a molecular marker for species identification. *Parasites & Vectors* **5**, 87.

Balaña-Fouce, R., Prada, C.F., Requena, J.M., Cushman, M., Pommier, Y., Álvarez-Velilla, R., Escudero-Martínez, J.M., Calvo-Álvarez, E., Pérez-Pertejo, Y., and Reguera, R.M. (2012). Indotecan (LMP400) and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 5264-5270.

Calvo-Álvarez, E., Guerrero, N.A., Álvarez-Velilla, R., Prada, C.F., Requena, J.M., Punzón, C., Llamas, M.A., Arevalo, F.J., Rivas, L., Fresno, M., Pérez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce, R. and Reguera, R.M. (2012). Appraisal of a *Leishmania major* Strain Stably Expressing mCherry Fluorescent Protein for Both In Vitro and In Vivo Studies of Potential Drugs and Vaccine against Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1927.

Requena, J.M. (2012). The Stressful Life of Pathogenic *Leishmania* Species. In: J.M. Requena (ed) *Stress Response in Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 323-346.

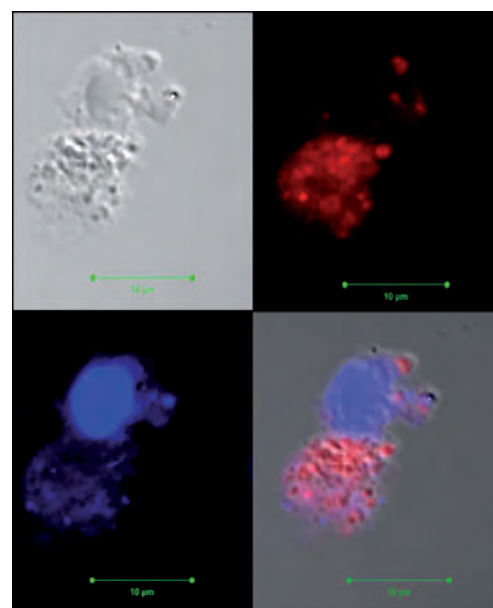


Figura 2. Macrófago de ratón infectado por una línea de *Leishmania* que tiene integrado en su genoma el gen para la proteína fluorescente mCherry.

Figure 2. Murine macrophage infected by a *Leishmania* line expressing the mCherry fluorescent protein.

Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias e investigación en nuevas terapias

Molecular basis of inherited metabolic diseases and research in novel therapies



Jefe de Línea / Group Leader:

Magdalena Ugarte
(hasta septiembre 2011)
Lourdes Ruiz Desviat

Personal Científico / Scientific Staff:

Belén Pérez
Pilar Rodríguez-Pombo
Eva María Richard
Alejandra Gámez

Postdoctoral / Postdoctoral Fellow:

Rocío Sánchez
(junio-diciembre 2012)

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Patricia Alcalde
Sandra Brasil
Lorena Gallego
Ana Jorge (hasta julio 2011)

Celia Medrano (CEDEM)

Alfonso Oyarzábal (CEDEM)

Rocío Sánchez (hasta Mayo 2012)

Patricia Yuste

Técnico de Investigación /

Technical Assistance:

Borja González (hasta octubre 2011)

Sven Calduch (hasta mayo 2012)

Estudiantes / Undergraduate Students:

Irene Bravo

Paula Díaz

Cristina Martín

Esther Martínez

Ainhoa Martínez

Elena Molina

Raquel Pérez

Ana Rivera

Virginia Ruiz

Javier Santos

Pablo Sierra

Personal Científico Asociado / Associate Scientific Staff:

Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM; www2.cbm.uam.es/cedem/).
Magdalena Ugarte, Celia Pérez-Cerdá, Begoña Marinero, Pedro Ruiz-Sala.

Personal Científico visitante / Visiting Scientist Staff:

América Susana (Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México) (septiembre-diciembre 2012)

Liliana Matos (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto, Portugal) (abril-junio 2011)

Paula Fernández Guerra (Aarhus University, Dinamarca) (De octubre 2012 a Enero 2013)

Kristell Klaassen (Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrado, Serbia) (octubre-diciembre 2012)

Resumen de investigación

El grupo pertenece al CIBER de Enfermedades Raras y al Instituto de Investigación Sanitaria IdiPAZ. Nuestro trabajo se centra en el estudio de las bases moleculares de diferentes enfermedades metabólicas hereditarias (EMH), su fisiopatología y del mecanismo molecular subyacente a los distintos tipos de mutaciones con el objetivo de identificar dianas terapéuticas y desarrollar nuevos tratamientos génicos y farmacológicos. Se están empleando *arrays* de SNP y oligos así como secuenciación masiva para la caracterización génica de los pacientes. Se ha identificado la implicación del gen PPM1K que codifica para la fosfatasa que regula el complejo BCKDH en la enfermedad jarabe de arce.

Hemos analizado el efecto de mutaciones sobre *splicing*, traducción y plegamiento de la proteína utilizando diferentes sistemas de expresión así como modelos celulares de enfermedad (fibroblastos de pacientes). Se ha confirmado la eficacia de la terapia antisentido para modular el *splicing*, aplicado a la recuperación funcional de mutaciones intrónicas y exónicas que generan sitios nuevos de *splicing* en diferentes EMH. Además se ha analizado la disfunción mitocondrial subyacente a varias de estas enfermedades revelando daño oxidativo reflejado por un aumento en los niveles de ROS y apoptosis que produciría la alteración en la morfología y en la respiración mitocondrial observada en las células de los pacientes. Estos resultados apuntan a la utilización de una nueva estrategia terapéutica con antioxidantes. Asimismo, se han analizado mutantes *missense* en aciduria metilmalónica y en defectos congénitos de glicosilación por deficiencia en la proteína fosfomanomutasa revelando un defecto en el plegamiento y estabilidad de la proteína, lo que ha conducido a la búsqueda de chaperonas farmacológicas para el tratamiento de estas enfermedades denominadas conformacionales. Por otra parte, se ha establecido la prueba de concepto del uso terapéutico de compuestos supresores de la terminación para tratar pacientes con acidurias orgánicas portadores de mutaciones *nonsense*.

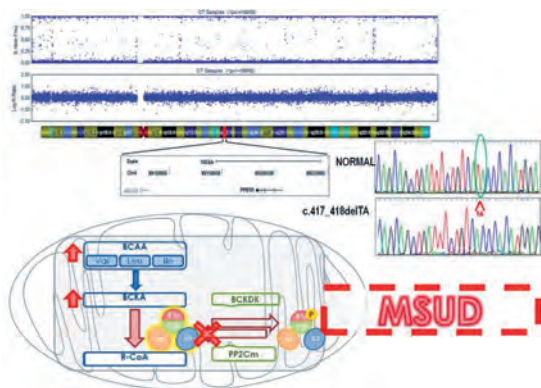


Figura 1. Tras análisis por SNP-arrays, secuenciación y estudios funcionales se ha descrito por primera vez la implicación de la fosfatasa mitocondrial PP2Cm en la enfermedad jarabe de arce.

Figure 1. We have described for the first time the involvement of mitochondrial phosphatase PP2Cm in maple syrup urine disease, after the analysis by SNP-arrays, sequencing and functional studies (Oyarzábal et al. 2012).

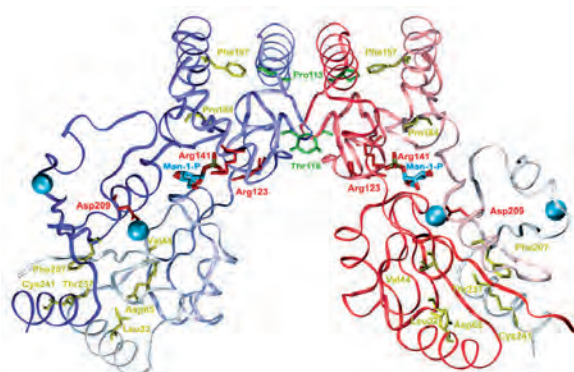


Figura 2. Análisis estructural de mutaciones *missense* en PMM2 identificadas en pacientes con defectos congénitos de glicosilación tipo Ia.

Figure 2. Structural analysis of missense changes in PMM2 identified in patients with congenital disorder of glycosylation type Ia (Vega et al. 2011).

Research summary

The group belongs to the Biomedical Network Research Center for Rare Diseases (CIBERER) and to Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPaz). Our work is focused on the research on the molecular basis of different inherited metabolic diseases (IMD), their cellular pathophysiology and the molecular mechanism of mutations identified in patients with the aim of identifying therapeutic targets and developing new genetic and pharmacological treatment strategies. New genomic technologies, based on arrays (SNPs and oligo-based) and massive parallel sequencing, have been implemented for the genetic characterization of patients.

We have analyzed the effect of mutations on splicing, translation and folding of the protein using different expression systems and cellular models of disease (patients' fibroblasts). The group has confirmed the efficiency of a gene specific antisense RNA-based therapy to modulate splicing, applied to intronic and exonic mutations generating new splice sites in different IMD. In addition we have analyzed the secondary mitochondrial dysfunction present in several IMD revealing oxidative damage which is reflected by the increase in ROS and apoptosis levels resulting in altered mitochondrial morphology and respiration as observed in patient cells. These results indicate that antioxidants could be used as a novel therapeutic strategy. We have characterized the stability and folding defect of missense mutants in methylmalonic aciduria and congenital defects in glycosylation due to a deficiency in phosphomannomutase, leading to the search for pharmacological chaperones for these diseases known as conformational diseases. We have established the proof-of-concept of the therapeutic use of readthrough drugs for nonsense mutation suppression in organic acidurias.

Publicaciones / Publications

Sánchez-Alcudia, R., Pérez, B., Pérez-Cerdá, C., Ugarte, M. and Desviat, L.R. (2011) Overexpression of adapted U1snRNA in patients' cells to correct a 5' splice site mutation in propionic academia. *Mol. Genet. Metab.* **102**, 134-138.

Alcaide, P., Merinero, B., Ruiz-Sala, P., Richard, E., Navarrete, R., Arias, A., Ribes, A., Artuch, R., Campistol, J., Ugarte, M. and Rodríguez-Pombo, P. (2011) Defining the pathogenicity of the creatine deficiency syndrome. *Hum Mutat.* **32**, 1-10.

Vega, A.I., Pérez-Cerdá, C., Abia, D., Gámez, A., Briones, P., Artuch, R., Desviat, L.R., Ugarte, M. and Pérez, B. (2011) Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency-congenital disorder of glycosylation. *J Inher Metab Dis.* **34**, 929-939.

Pérez, B., Briones, P., Quelhas, D., Artuch, R., Vega, A.I., Quintana, E., Gort, L., Ecay, M.J., Matthijs, G., Ugarte, M. and Pérez-Cerdá, C. (2011) The molecular landscape of phosphomannomutase deficiency in Iberian Peninsula: identification of fifteen population-specific mutations. *J Inher Metab Dis.* **34**, 1103-1111.

Arrabal, L., Teresa, L., Sánchez-Alcudia, R., Castro, M., Medrano, C., Gutiérrez-Solana, L., Roldán, S., Ormazábal, A., Pérez-Cerdá, C., Merinero, B., Pérez, B., Artuch, R., Ugarte, M. and Desviat, L.R. (2011) Genotype-phenotype correlations in sepiapterin reductase deficiency. A splicing defect accounts for a new phenotypic variant. *Neurogenetics* **12**, 183-191.

Brasil, S., Viecelli, H.M., Meili, D., Rassi, A., Desviat, L.R., Pérez, B., Ugarte, M. and Thöny, B. (2011) Pseudoexon exclusion by antisense therapy in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Hum Mutat.* **32**, 1019-1027.

Lam, C., Desviat, L.R., Pérez-Cerdá, C., Ugarte, M., Barshop, B.A. and Cederbaum, S. (2011) 45-Year-old female with propionic acidemia, renal failure, and premature ovarian failure; late complications of propionic acidemia? *Mol Genet Metab.* **103**, 338-340.

Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., Arranz, J.A., Del Toro, M., Labayru, M.T., Landa, J., Font, A., García-Villoria, J., Merinero, B., Ugarte, M., Gutiérrez-Solana, L.G., Campistol, J., García-Cazorla, A., Vaquerizo, J., Riudor, E., Briones, P., Elpeleg, O., Ribes, A. and Lill, R. (2011) A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am J Hum Genet.* **89**, 656-667.

Yahyaoui, R., Espinosa, M.G., Gómez, C., Dayaldasani, A., Rueda, I., Roldán, A., Ugarte, M., Lastra, G., and Pérez, V. (2011) Neonatal carnitine palmitoyltransferase II deficiency associated with Dandy-Walker syndrome and sudden death. *Mol Genet Metab* **104**, 414-416.

Sarkissian, C.N., Kang, T.S., Gámez, A., Scriver, C.R., Stevens, R.C (2011) Evaluation of orally administered PEGylated phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of Phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab* **104**, 249-254.

Pérez, B., Nevado, J., Lapunzina, P., Gallego, L., Pérez-Cerdá, C., Merinero, B., Ugarte, M. and Desviat, L.R. (2012) Segmental uniparental disomy leading to homozygosity for a pathogenic mutation in three recessive metabolic diseases. *Mol Genet Metab.* **105**, 270-271.

Casado, M., O'Callaghan, M.M., Montero, R., Pérez-Cerdá, C., Pérez, B., Briones, P., Quintana, E., Muchart, J., Aracil, A., Pineda, M. and Artuch, R. (2012) Mild Clinical and Biochemical Phenotype in Two Patients with PMM2-CDG (Congenital Disorder of Glycosylation Ia). *Cerebellum* **11**, 557-563.

Pérez-Dueñas, B., Sempere, A., Campistol, J., Alonso-Colmenero, I., Díez, M., González, V., Merinero, B., Desviat, L.R. and Artuch, R. (2012) Novel features in the evolution of adenylosuccinate lyase deficiency. *Eur J Paediatr Neurol.* **16**, 343-348.

Desviat, L.R., Pérez, B. and Ugarte, M. (2012) Minigenes to confirm exon skipping mutations. *Methods Mol Biol.* **867**, 37-47.

Giménez, C., Pérez-Siles, G., Martínez-Villarreal, J., Arribas-González, E., Giménez, E., Núñez, E., de Juan-Sanz, J., Fernández-Sánchez, E., García-Tardón, N., Ibáñez, I., Romanelli, V., Nevado, J., James, V.M., Topf, M., Chung, S.K., Thomas, R.H., Desviat, L.R., Aragón, C., Zafra, F., Rees, M.I., Lapunzina, P., Harvey, R.J. and López-Corcua, B. (2012) A novel dominant hyperekplexia mutation Y705C alters trafficking and biochemical properties of the presynaptic glycine transporter GlyT2. *J Biol Chem.* **287**, 28986-29002.

Sánchez-Alcudia, R., Pérez, B., Ugarte, M. and Desviat, L.R. (2012) Feasibility of nonsense mutations readthrough as a novel therapeutic approach in propionic acidemia. *Hum Mutat* **33**, 973-980.

Pérez, B., Rodríguez-Pombo, P., Ugarte, M. and Desviat, L.R. (2012) Readthrough strategies for therapeutic suppression of nonsense mutations in inherited metabolic disease. *Mol Syndromol* **3**, 230-236.

Manara, R., Del Rizzo, M., Burlina, A.P., Bordugo, A., Citton, V., Rodríguez-Pombo, P., Ugarte, M. and Burlina, A.B. (2012) Wenicke-like encephalopathy during classic maple syrup urine disease decompression. *J Inher Metab Dis.* **35**, 413-417.

Arroyo-Carrera I., Matthijs, G., Perez, B. and Pérez-Cerdá, C. (2012) DPAGT1-CDG: Report of a patient with fetal hypokinesia phenotype. *Am J Med Genet Part A* **158**, 2027-2030.

Gámez, A., Sarkissian, C.N., Cheng, S.F., Dorenbaum, A., Scott P., Tomaro, J., Scriver, C.R. and Stevens, R.C. (2012) Chaperone like therapy with Tetrahydrobiopterin: Clinical trials evaluate Genotype-Phenotype Correlations in Phenylketonuria. *J. Inher. Metab. Dis. Reports.* **5**, 59-70.

CAPÍTULOS DE LIBROS:

Merinero B., Perez-Cerdá C., Desviat L.R., Pérez B., Rodríguez-Pombo P., Richard E., Ugarte M. (2011) Mitochondrial organic acidurias: Part I: Biochemical and molecular basis. In: Cadenas S., Palau F. (eds) Mitochondrial Pathophysiology. Research Signpost, Kerala, India, pp.145-171. ISBN: 978-81-7895-514-8.

Richard E., Rodríguez-Pombo P., Desviat L.R., Pérez B., Merinero B., Pérez-Cerdá C., Ugarte M. (2011) Mitochondrial organic acidurias: Part II: Mitochondrial dysfunction. In: Cadenas S., Palau F. (eds) Mitochondrial Pathophysiology. Research Signpost, Kerala, India, pp.173-191. ISBN: 978-81-7895-514-8.

Pérez B., García M.J., Desviat L.R., Ugarte M. (2011) Diagnóstico bioquímico y molecular de las hiperfenilalaninurias. En "Guía clínica para el diagnóstico, tratamiento y registro de pacientes con hiperfenilalanemia en España" En: Asociación para el Estudio de Española para el Estudio de Errores Congénitos del Metabolismo (ed), R.B. Servicios Editoriales, S.L., Madrid, pp.19-27. ISBN:978-84-694-7314-6

Desviat L.R., Pérez B., Ugarte M. (2012) Minigenes to confirm exon skipping mutations. In Aartsma-Rus, A.M. (ed) Exon Skipping. Methods in Molecular Biology volume 867, Humana Press, pp.37-47. ISBN:9781617797668.

Pérez B., Ugarte M., Desviat L.R. (2012). RNA-based therapies for inherited metabolic diseases. In Erdmann V.A., Barciszewski J. (eds). From Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 357-370. ISBN: 9783642274251.

Patentes / Patents

Desviat L.R., Pérez B., Santos-Simarro F., Vallespín E., Palomares M., Lapunzina P., Rodríguez-Pombo P., Ugarte M., Nevado J.. Marca Registrada: MetabolArray®

España-M2958711-5; Comunitario-010009348; Estados Unidos - 85334903

Propietario: FIBHULP-IdiPAZ-Hospital Universitario La Paz

Tesis doctorales / Doctoral theses

Patricia Alcaide (2011) Definiendo la etiopatogénesis del síndrome de deficiencia de creatina cerebral. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: B. Merinero y P. Rodríguez Pombo.

Ana Jorge Finnigan (2011) Búsqueda de nuevas dianas y estrategias terapéuticas en aciduria metilmalónica. Universidad Autónoma de Madrid. Director: B. Pérez.

Rocío Sánchez Alcudia (2012) Caracterización de CNV, mutaciones de splicing y nonsense en enfermedades metabólicas hereditarias. Investigación en terapias personalizadas. Universidad Autónoma de Madrid. Director: L.R. Desviat.

Replicación y transcripción del DNA del bacteriófago $\phi 29$ *Replication and transcription of bacteriophage $\phi 29$ DNA*

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Margarita Salas Falgueras

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Ana Camacho (hasta Febrero de 2011)
Miguel de Vega José
Mario Mencía Caballero

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Benito Baños Piñero
(hasta Octubre de 2012)
Laura Mojardín Menéndez
Daniel Muñoz Espín
(hasta Abril de 2011)
Modesto Redrejo Rodríguez
Irene Rodríguez García

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance:*
José M^a Lázaro Bolós
M^a Angeles Martínez Villarraso
Laurentino Villar García

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
David Ballesteros Plaza
Mónica Berjón Otero
(desde Diciembre de 2012)
Ana de Ory López
(desde Diciembre de 2012)
Pablo Gella Montero
Isabel Holguera López
Alicia del Prado Díaz
M^a Eugenia Santos del Río

Científico Visitante / *Visiting Scientist:*
Nadine Fornelos



Resumen de investigación

Hemos continuado con el estudio del mecanismo de replicación del DNA de $\phi 29$ que se inicia mediante la proteína terminal (TP). La base 3' terminal del molde es esencial para determinar cual es el nucleótido interno que inicia la replicación del DNA de $\phi 29$. Aminoácidos de los dominios intermedio y "priming" de la TP están implicados en la formación de un heterodimero estable y funcional con la DNA polimerasa de $\phi 29$. Hemos caracterizado señales de localización nuclear (NLSs) eucarióticas en la TP de $\phi 29$ y de otros bacteriófagos cuya función puede ser facilitar la transferencia horizontal de genes entre procariotas y eucariotas. En colaboración con el Dr. Borja Ibarra hemos determinado la dinámica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ por la que se acoplan las reacciones de replicación y apertura de cadena. Hemos analizado la localización subcelular de la proteína p6 de $\phi 29$. Al comienzo de la infección la p6 localiza en una configuración periférica tipo hélice y posteriormente es reclutada en el nucleóide bacteriano, para lo que se requiere la síntesis del DNA viral. Mediante el uso de los extremos del DNA de $\phi 29$ y el sistema de replicación de $\phi 29$ hemos obtenido amplificación de DNA heterólogo iniciada con TP. La proteína p56 de $\phi 29$ es un inhibidor de la uracil-DNA glicosilasa (UDG) de *B. subtilis* impidiendo su unión al DNA, evitando el efecto inhibitor de la UDG sobre la replicación del DNA de $\phi 29$. En colaboración con el Dr. Juan Luís Asensio hemos determinado la estructura tridimensional de la p56.

Uno de los motivos HhH del subdominio *fingers* de la DNA polimerasa X de *B. subtilis* juega un papel en la coordinación de las actividades de polimerización, exonucleasa 3'-5' y AP endonucleasa de este tipo de polimerasas durante la resección de extremos 3' desapareados o en la reparación de sitios abásicos.

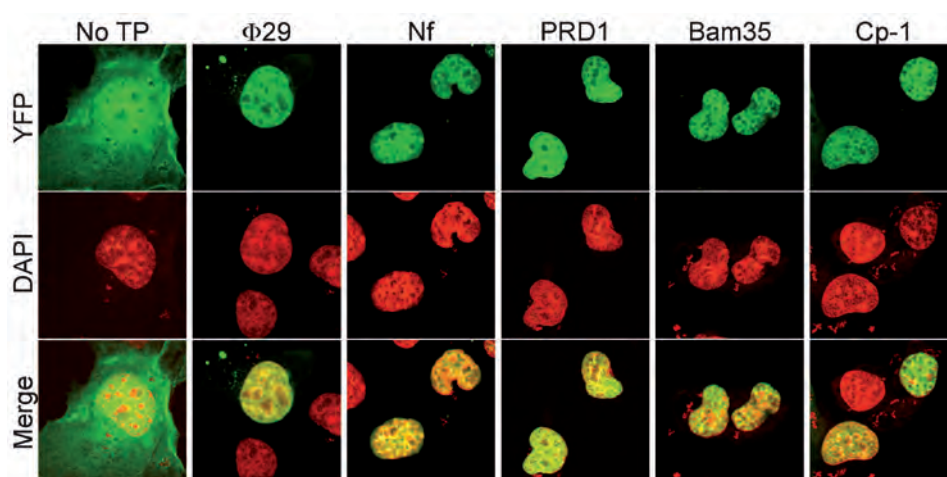


Figura 1. Localización nuclear de proteínas terminales (TP) de bacteriófagos.

Figure 1. Nuclear localization of bacteriophage terminal proteins (TP).

Research summary

We have continued with the study of the structural and functional bases of the mechanism of $\phi 29$ DNA replication initiated by TP-priming. For the replication of $\phi 29$ DNA, the 3' terminal base in the template is essential to determine the internal nucleotide that initiates replication. Amino acids of the TP intermediate and priming domains are involved in the formation of a stable and functional heterodimer with the $\phi 29$ DNA polymerase. We have characterized eukaryotic nuclear localization signals (NLSs) in the TP of $\phi 29$ and other bacteriophages. In $\phi 29$, residues 1-37 at the N-terminal domain contain a functional NLS. We suggest a common function of bacteriophage TPs facilitating the horizontal transfer of genes between prokaryotes and eukaryotes. In collaboration with Dr. Borja Ibarra, using optical tweezers, we have determined the dynamics to couple unwinding and replication reactions by the $\phi 29$ DNA polymerase. We have analysed the subcellular localization of the histone-like protein p6 of $\phi 29$. At early infection stages, it localizes in a peripheral helix-like configuration and later is recruited at the bacterial nucleoid. This migration process requires the synthesis of viral DNA. We have developed a DNA amplification system primed by the $\phi 29$ TP based on the minimal replication origins of $\phi 29$ DNA. The $\phi 29$ protein p56 is an inhibitor of the *B. subtilis* uracil-DNA glycosylase (UDG) by avoiding its binding to DNA, thus preventing the $\phi 29$ DNA replication impairment caused by the uracil excision activity of UDG. In collaboration with Dr. Juan Luis Asensio, we have determined the 3D structure of p56.

Site-directed mutagenesis at residues of one of the *B. subtilis* DNA polymerase X HhH motifs of the fingers subdomain, have led to infer a role in the coordination of the polymerization, 3'-5' exonucleolysis and AP-endonucleolysis activities of this kind of polymerases, during the resection of a mismatched 3' terminus or through the repair of an abasic site.

Publicaciones / Publications

Pérez-Lago, L., Serrano-Heras, G., Baños, B., Lázaro, J.M., Alcorlo, M., Villar, L. and Salas, M. (2011). Characterization of *Bacillus subtilis* Uracil-DNA glycosylase and its inhibition by phage $\phi 29$ protein p56. *Mol. Microbiol.* **80**, 1657-1666.

Mencia, M., Gella, P., Camacho, A., de Vega, M. and Salas, M. (2011). Terminal protein-primed amplification of heterologous DNA with a minimal replication system based on phage $\phi 29$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 18655-18660.

Asensio, J.L., Pérez-Lago, L., Lázaro, J.M., González, C., Serrano-Heras, G. and Salas, M. (2011). Novel dimeric structure of phage $\phi 29$ -encoded protein p56: Insights into uracil-DNA glycosylase inhibition. *Nucl. Acids Res.* **39**, 9779-9788.

del Prado, A., Villar, L., de Vega, M. and Salas, M. (2011). Involvement of residues of the $\phi 29$ Terminal Protein intermediate and priming domains in the formation of a stable and functional heterodimer with the replicative DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* **40**, 3886-3897.

Bekmann, B.M., Hoch, F.G., Marz, M., Willkomm, D.K., Salas, M. and Hartmann, R.K. (2012). A pRNA-induced structural rearrangement triggers 6S-1 RNA release from RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **31**, 1727-1738.

Holguera, I., Ballesteros-Plaza, D., Muñoz-Espín, D. and Salas, M. (2012). Disclosing the in vivo organization of a viral histone-like protein in *Bacillus subtilis* mediated by its capacity to recognize the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 5723-5728.

Salas, M. (2012). Severo Ochoa. Biochemistry as a hobby. *IUBMB Life*. **64**, 564-566.

Morin, J.A., Cao, F.J., Lázaro, J.M., Arias-Gonzalez, J.R., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., Salas, M. and Ibarra, B. (2012). Active DNA unwinding dynamics during processive DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 8115-8120.

Baños, B., Villar, L., Salas, M. and de Vega, M. (2012). DNA stabilization at the *Bacillus subtilis* PolX core. A binding model to coordinate polymerase, AP-endonuclease and 3'-5' exonuclease activities. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9750-9762.

Mendieta, J., Pérez-Lago, L., Salas, M. and Camacho, A. (2012). Functional specificity of a protein-DNA complex mediated by two arginines bound to the minor groove. *J. Bacteriol.* **194**, 4727-4735.

Morin, J.A., Cao, F.J., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., Salas, M. and Ibarra, B. (2012). Manipulation of single polymerase-DNA complexes: A mechanical view of DNA unwinding during replication. *Cell Cycle Features* **11**, 2967-2968.

Rodríguez, I., Longás, E., de Vega, M. and Salas, M. (2012). The essential role of the 3' terminal template base in the first steps of protein-primed DNA replication. *PLoS ONE* **7**, 48257.

Redrejo-Rodríguez, M., Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Mencia, M. and Salas, M. (2012). Functional eukaryotic nuclear localization signals are widespread in terminal proteins of bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 18482-18487.

Salas, M. (2012). My life with bacteriophage $\phi 29$. *J. Biol. Chem.* **287**, 44568-44579.

de Vega, M. and Salas, M. (2011). Protein-primed replication of bacteriophage $\phi 29$ DNA. DNA Replication and Related Cellular Processes. Ed. By Jelena Kusic-Tisma. INTECH. pp. 179-206 (Capítulo de libro).

Salas, M. (2012). $\phi 29$ -like Viruses (Podoviridae). The Springer Index of Viruses. Eds. by Drs. Christian Tidona and Gholamreza Darai. pp. 1347-1354 (Capítulo de libro).

Salas, M. "Severo Ochoa". (2012). The 2nd edition, Brenner's Online Encyclopedia of Genetics. Eds. by Drs. Stanley Maloy and Kelly Hughes (Capítulo de libro).

Muñoz-Espín, D., Serrano-Heras, G. and Salas, M. (2012). Role of Host Factors in Bacteriophage $\phi 29$ DNA Replication. In Małgorzata Łobocka and Wacław T. Szybalski, editors: Advances in Virus Research, Vol. 82, Burlington: Academic Press, 2012, pp. 351-383 (Capítulo de libro).

Hauser, R., Blasche, S., Dokland, T., Haggard-Ljungquist, E., von Brunn, A., Salas, M., Casjens, S., Molineux, J. and Uetz, P. (2012). Bacteriophage protein-protein interactions. Advances in Virus Research, Part B. Vol. 83, Burlington: Academic Press, 2012, pp 220-299 (Capítulo de libro).

Patentes / Patents

Método de amplificación de ADN basado en los orígenes de replicación del bacteriófago $\phi 29$ y secuencias nucleotídicas asociadas.

Inventores: Margarita Salas Falgueras, Mario Mencia Caballero, Miguel de Vega José, José M^a Lázaro Bolós, Pablo Gella Montero
Propietario: Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Fecha de publicación: March 3, 2011

Inhibitor of the uracil-DNA glycosylase enzyme and use thereof
Inventores: Gemma Serrano de las Heras, Alicia Bravo García, Margarita Salas Falgueras
Propietario: Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Patente número: US 8,129,336 B1
Fecha de publicación: Marzo de 2012

Utilización de señales de localización nuclear de proteínas de bacteriófagos como vehículo para transferencia de genes
Inventores: Margarita Salas Falgueras, Mario Mencia Caballero, Modesto Redrejo Rodríguez, Daniel Muñoz Espín, Isabel Holguera López
Propietario: Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Fecha de presentación: Julio de 2012

Premios / Awards

Distinción calle "Margarita Salas" en el Parque Científico-Tecnológico de Almería (PITA) (2011).

Doctora Honoris Causa por la UNED (2011).

Miembro del Comité Consejero Internacional "Campus Mare Nostrum" de la Universidad de Murcia (2011).

Doctora Honoris Causa por la Universidad Internacional Menéndez Pelayo (2011).

Premio Socio de Honor de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM) (2011).

Premio Prismas Casa de las Ciencias a la Divulgación. Museos Científicos Coruñeses. Ayuntamiento de A Coruña (2011).

Miembro del Comité Asesor del 22 Congreso de IUBMB y del 37 de FEBS. (2012).

Premio Honorífico "Clara Campoamor" 2011. Dirección General de Igualdad de Oportunidades del Ayuntamiento de Madrid (2012).

Distinción Carrer de Margarita Salas (Científica) concedida por el Ajuntament de Valencia en Valencia (2012).

Denominación "Margarita Salas" al Premio de Investigación al mejor trabajo publicado por jóvenes investigadores en el área de Ciencias que concede la Fundación de la Universidad de Málaga (2012).

Denominación Margarita Salas al Laboratorio de Ciencias del Instituto de Enseñanza Secundaria Ramón y Cajal de Albacete (2012).

Miembro del Comité Científico del VI Congreso de la Federación Española de Biotecnólogos (2012).

Doctora Honoris Causa por la Universidad de Jaén (2012).

Otras actividades / Other activities

Co-dirigió la asignatura de Estabilidad de Genomas: Replicación, Reparación y Mutagénesis del Master Biología Molecular y Celular englobado en el Programa Oficial de Posgrado de Biociencias Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid (2010-2011), (2011-2012) y (2012-2013).

Co-dirigió el Curso "Fronteras de la Biomedicina en la era genómica" de la Escuela de Biología Molecular "Eladio Viñuela". Universidad Internacional Menéndez Pelayo. Santander (2011).

Organizó la IX Semana de la Ciencia del Ayuntamiento de Lueca. Asturias 2011 y 2012.

Co-organizadora del Workshop "Polymerases involved in DNA replication, repair and mutagenesis" Cantoblanco Workshops on Biology. CBMSO 2012.

Co-dirigió el Curso "Nuevos retos en la investigación biomédica" de la Escuela de Biología Molecular "Eladio Viñuela". Universidad Internacional Menéndez Pelayo. Santander (2012).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Benito Baños Piñero (2011). Caracterización bioquímica de la DNA polimerasa X de *B. subtilis*./ Director: Miguel de Vega José.

Replicación cromosómica y estabilidad del genoma

Chromosome replication and genome stability

Jefe de Línea / *Group Leader*:
José Antonio Tercero Orduña

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*:
Irene Saugar Gómez

Becarios Predoctorales / *Graduate Students*:
María Gallo Fernández
Alberto Jiménez Martín
M^a Ángeles Ortiz Bazán

Resumen de investigación

Nuestro grupo está interesado en el estudio de los mecanismos que las células eucariotas utilizan para preservar la integridad del genoma durante la replicación cromosómica, especialmente cuando el DNA está dañado. Para ello empleamos como modelo de trabajo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Durante este periodo hemos estudiado la regulación de la endonucleasa específica de estructura Mus81-Eme1/Mms4, un complejo heterodimérico conservado evolutivamente. Hemos encontrado que su función está estrictamente controlada durante el ciclo celular mitótico mediante la fosforilación de la subunidad no catalítica Mms4 por las quinasas Cdc28 (CDK) y Cdc5 (quinasa del tipo Polo). La modificación de esta proteína ocurre al final de la fase S pero antes de la segregación cromosómica, y es necesaria para la actividad nucleasa de Mus81-Mms4. El modo de regulación de esta endonucleasa previene su función durante la replicación cromosómica y las posibles consecuencias negativas para la estabilidad del genoma derivadas de su acción nucleolítica. Al mismo tiempo, proporciona un mecanismo de salvaguarda para resolver intermediarios de DNA que puedan permanecer después de la replicación y requieran ser procesados antes de la mitosis.

Hemos estudiado también el papel de los componentes de la ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el DNA durante la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el DNA causadas por el agente alquilante MMS. Hemos encontrado que la rama libre de error de esta ruta, mediada por la E3-ubiquitina ligasa Rad5 (HLTF/SHPRH en humanos), tiene un papel principal en la tolerancia al daño en el DNA provocado por el MMS durante la fase S. Por el contrario, las polimerasas de síntesis a través de lesiones tienen una contribución minoritaria en esta respuesta celular. Rad5 es crucial para completar la replicación cromosómica bajo estas condiciones de daño en el DNA, y sus actividades helicasa y Ubiquitina-ligasa son necesarias para esta función.

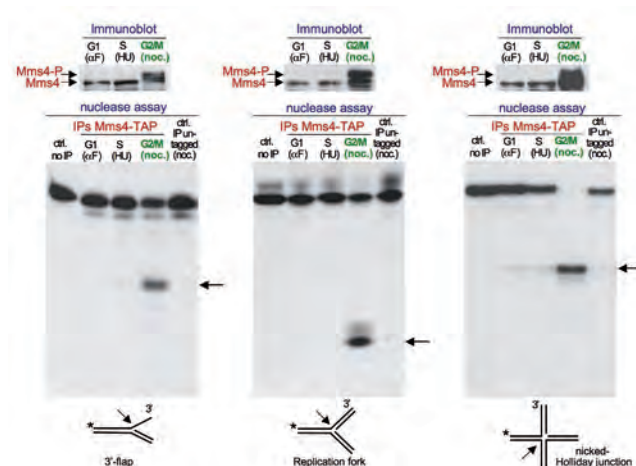


Figura 1. La fosforilación de Mms4 es necesaria para la actividad nucleasa del complejo Mus81-Mms4.

Figure 1. Mms4 phosphorylation is required for the nuclease activity of the Mus81-Mms4 complex.

Research summary

Our group is interested in the study of the mechanisms that eukaryotic cells use to preserve genome integrity during chromosome replication, especially when the DNA is damaged. For this we use the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a working model.

During this period we have studied the regulation of the structure-specific endonuclease Mus81-Eme1/Mms4, an evolutionarily conserved heterodimeric complex. We have found that its function is strictly controlled during the mitotic cell cycle by Cdc28 (CDK)- and Cdc5 (Polo-like kinase)-dependent phosphorylation of the non-catalytic subunit Mms4. The modification of this protein occurs at the end of S phase but before chromosome segregation, and is necessary for the nuclease activity of Mus81-Mms4. The mode of regulation of this endonuclease prevents its function during chromosome replication and the possible negative consequences for genome stability derived from its nucleolytic action. Yet, it provides a safeguard mechanism to resolve DNA intermediates that may remain after replication and require processing before mitosis.

We have also studied the role of the components of the RAD6/RAD18 pathway of DNA damage tolerance during chromosome replication in the presence of DNA lesions caused by the alkylating agent MMS. We have found that the error-free branch of this pathway, mediated by the E3-ubiquitin ligase Rad5 (human HLTf/SHPRH), has a major role in tolerance to MMS-induced DNA damage during S phase. On the contrary, the translesion synthesis polymerases have only a minor contribution to this cellular response. Rad5 is crucial for the completion of chromosome replication under these DNA-damaging conditions, and both its helicase and Ubiquitin-ligase activities are required for this function.

Publicaciones / Publications

Gallo-Fernández, M., Saugar, I., Ortiz-Bazán, M. A., Vázquez, M. V. and Tercero, J. A. (2012) Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8325-8335.

Tesis doctorales / Doctoral theses

María Victoria Vázquez Sarrión (2012). Análisis de factores implicados en la respuesta celular al daño en el DNA durante la replicación cromosómica en *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José Antonio Tercero.

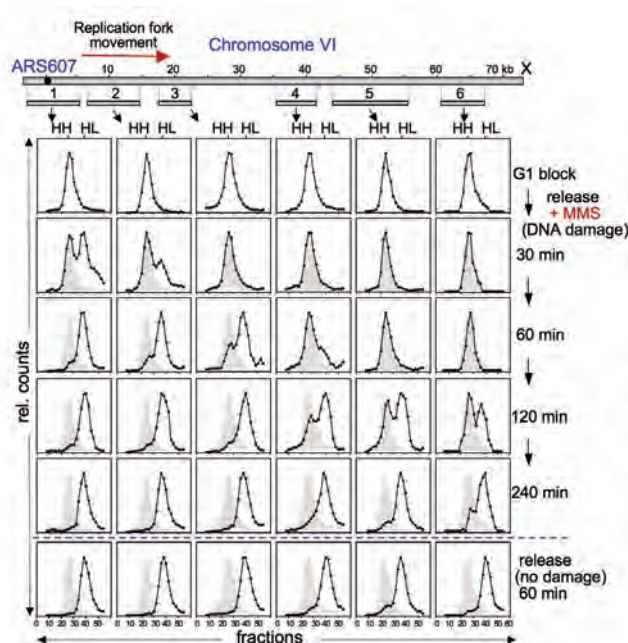
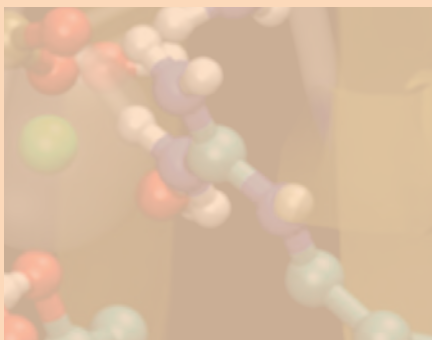


Figura 2. Análisis de la progresión de las horquillas de replicación a lo largo de un replicón del cromosoma VI de *S. cerevisiae*, en presencia (+MMS) o en ausencia de daño en el DNA, mediante la técnica de sustitución de isótopos de densidad. HH: DNA no replicado. HL: DNA replicado.

Figure 2. Analysis of DNA replication fork progression along a replicon of chromosome VI of *S. cerevisiae*, either in the presence (+MMS) or in the absence of DNA damage, using the dense isotope substitution technique. HH: unreplicated DNA. HL: replicated DNA.

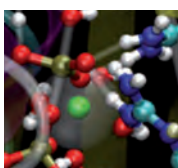


172

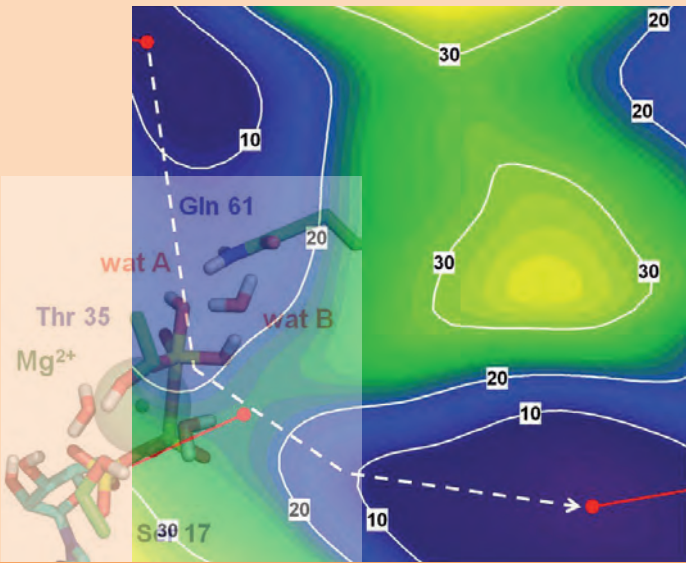
Unidad de Bioinformática
Bioinformatics Unit
Ugo Bastolla Bufalini

174

Grupo de Modelado Molecular
Molecular Modelling Group
Paulino Gómez-Puertas



UNIDAD DE BIOINFORMÁTICA
Bioinformatics Unit



UNIDAD DE Y BIOINFORMÁTICA

Bioinformatics Unit



UNIDAD DE BIOINFORMÁTICA

BIOINFORMATICS UNIT



Jefe de Unidad / *Unit Leader*:
Ugo Bastolla Bufalini

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*:
Antonio Morreale de León
Raúl Méndez Giradles
Miguel Arenas Bustos

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Alberto Pascual García
Javier Klett Arroyo
Helena Gomes dos Santos
Álvaro Cortés Cabrera

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Alfonso Núñez Salgado

Científicos visitantes /
Visiting Scientists:
Markus Porto
(Alemania)
Ludovica Bachschmid-Romano
(Italia)

Resumen de investigación

1) Estabilidad, dinámica y evolución de proteínas. Nuestro grupo desarrolla modelos matemáticos para predecir la estabilidad de plegamiento de las proteínas, el efecto de las mutaciones, la cinética del plegamiento, la estabilidad frente a plegamientos incorrectos y las presiones selectivas asociadas. Mediante estos modelos, simulamos la evolución de las proteínas y el efecto del proceso evolutivo (tasa y sesgo de mutación, tamaño de población) sobre su estabilidad. Nuestro modelo de red elástica de ángulos de torsión permite simular la dinámica de equilibrio de las proteínas, caracterizar sitios alostéricos y sitios catalíticos, y distinguir los movimientos funcionales de los cambios de conformación en respuesta a una perturbación aleatoria. En este marco, estamos desarrollando una función de energía para predecir los cambios de conformación y sus barreras de energía. Estudiamos la evolución de las regiones desordenadas de las proteínas, y su contribución a la complejidad del organismo.

2) Ecología teórica y redes bacterianas. Investigamos los factores que influyen sobre la biodiversidad de los ecosistemas, en particular competición y mutualismo. Analizando co-ocurrencias de bacterias en muestras ambientales, predecimos sus redes de interacciones y hemos propuesto que las interacciones mutualistas favorecen cosmopolitismo y biodiversidad.

3) Secuenciación. Hemos desarrollado el algoritmo ZPeaks para detectar picos en experimentos de secuenciación, aplicándolo al análisis de orígenes de replicación.

4) Diseño de fármacos (Antonio Morreale). Hemos completado una nueva versión de nuestra plataforma automática de cribado virtual VSDMIP, que permite encontrar potenciales fármacos basados en la estructura de la proteína diana o de ligandos conocidos, beneficiándose del entorno gráfico del programa PyMOL. Hemos mejorado nuestro algoritmo de docking y la función de puntuación, y hemos explorado una nueva aproximación al diseño de fármacos. Nuestra nueva aplicación web AtlasCBS permite caracterizar el espacio químico-biológico del diseño de fármacos. Nuestra experiencia en modelado molecular ha producido numerosas colaboraciones tanto dentro como fuera del CBMSO y una solicitud de patente.

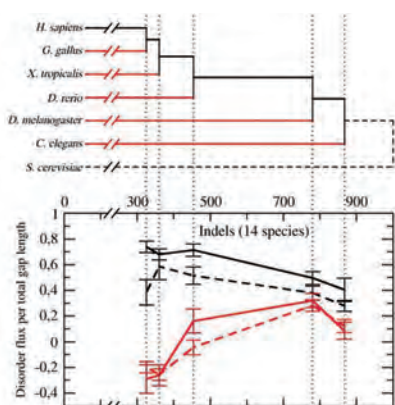


Figura 1. Las regiones desordenadas son abundantes en los complejos de proteínas como el Centrosoma. Su evolución mediante grandes inserciones es acelerada a lo largo de las ramas donde la complejidad del organismo ha aumentado más.

Figure 1. Disordered regions are abundant in protein complexes such as the Centrosome. Their evolution through large insertions is accelerated along branches in which the complexity of the organism increased.

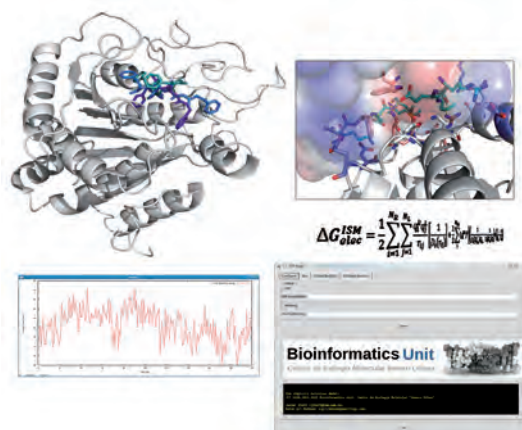


Figura 2. Representación gráfica que expresa nuestros intereses y logros en docking y evaluación.

Figure 2. Composite view depicting our interests and accomplishments in docking and scoring.

Research summary

- 1) *Stability, dynamics and evolution of proteins.* Our group develops mathematical models for predicting protein folding stability, the effect of mutations, stability against misfolding and the corresponding selective pressures. We apply these models to simulate protein evolution and the effect of the evolutionary process (mutation rate, mutation bias, population size) on protein stability. Our torsional network model (TNM) allows simulating the equilibrium dynamics of proteins, characterizing allosteric and catalytic sites, and telling functional movements from conformation changes in response to a random perturbation. Within the TNM, we are developing an energy function to predict conformation changes and energy barriers. We study the evolution of disordered protein regions and their contribution to organism complexity.
- 2) *Theoretical ecology and bacterial networks.* We investigate the factors that influence ecosystem diversity, in particular competition and mutualism. By analyzing co-occurrences of bacteria in environmental samples, we predict their interaction networks and we proposed that mutualistic interactions favor bacterial cosmopolitanism and biodiversity.
- 3) *Next generation sequencing.* We developed the algorithm ZPeaks to detect peaks in sequencing experiments, and we applied it to the analysis of replication origins.
- 4) *Drug design (line directed by Antonio Morreale).* We completed a new version of our automatic platform for virtual screening VSDMIP, which allows finding candidate drugs based on the structure of the target protein or of known ligands, exploiting the graphical interface of the program PyMOL. We improved our docking algorithm and our scoring function, and we explored a new approach to drug design. Our new web application AtlasCBS allows mapping the chemical-biological space of drug design. Our experience with molecular modeling produced several collaborations, within as well as outside the CBMSO, and a patent application.

Publicaciones / Publications

Bastolla, U., Bruscolini, P., and Velasco, J.L. (2012) Sequence determinants of protein folding rates: Positive correlation between contact energy and contact range indicates selection for fast folding. *Proteins* **80**:2287-2304.

Liberles, D.A., et al. (2012) The interface of protein structure, protein biophysics and molecular evolution. *Protein Sci.* **21**:769-785.

Nido, G.S., Méndez, R., Pascual-García, A., Abia, D. and Bastolla, U. (2012) Protein disorder in the centrosome correlates with complexity in cell types number. *Mol. BioSystems*, **8**:353-367.

Bastolla, U. and Porto, M. (2012) Modeling structural and genomic constraints in the evolution of proteins. In: Dokholyan, N. (ed) Computational Modeling of Biological Systems: From Molecules to Pathways. Springer Verlag, New York, U.S.A.

Maalej, E., Chabchoub, F., Samadi, A., de los Ríos, C., Perona, A., Morreale, A., and Marco-Contelles, J. (2011) Synthesis, biological assessment and molecular modeling of 14-aryl-10,11,12,14-tetrahydro-9H-benzo[5,6]chromeno[2,3-b]quinolin-13-amines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 2384-2388.

Pérez-Siles, G., Morreale, A., Leo-Macias, A., Pita, G., Ortiz, A.R., Aragón, C., and López-Corcuera, B. (2011) Molecular basis of the differential interaction with lithium of glycine transporters GLYT1 and GLYT2. *J. Neurochem.* **118**, 195-204.

Cortés-Cabrera, A., Gil-Redondo, R., Perona, A., Gago, F., and Morreale, A. (2011) VSDMIP 1.5: an automated structure- and ligand-based virtual screening platform with a PyMOL graphical user interface. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **25**, 813-824.

Coderch, C., Morreale, A., and Gago, F. (2012) Tubulin-based structure-affinity relationships for antimetabolic Vinca alkaloids. Anti-cancer agents in medicinal chemistry **12**, 219-225.

Pérez-Siles, G., Núñez, E., Morreale, A., Jiménez, E., Leo-Macias, A., Pita, G., Cherubino, F., Sangaletti, R., Bossi, E., Ortiz, A.R., Aragón, C., and López-Corcuera, B. (2012) An external vestibule aspartate of glycine transporter 2 (GLYT2) controls cation access and transport coupling. *Biochem. J.* **442**, 323-334.

Bueren-Calabuig, J., Negri, A., Morreale, A. and Gago, F. (2012) Rationale for the opposite stereochemistry of the major monoadducts and interstrand crosslinks formed by mitomycin C and its decarbamoylated analogue at CpG steps in DNA and the effect of cytosine modification on reactivity. *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 1543-1552.

Cortés-Cabrera, A., Gago, F., and Morreale, A. (2012) A reverse combination of structure-based and ligand-based strategies for virtual screening. *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **26**, 319-327.

Coderch, C., Klett, J., Morreale, A., Díaz, J.F., and Gago, F. (2012) Comparative Binding Energy (COMBINE) analysis supports a proposal for the binding mode of epothilones to beta-tubulin. *ChemMedChem*, **7**, 836-846.

Cortés-Cabrera, A., Morreale, A., Gago, F. and Abad-Zapatero, C. (2012) AtlasCBS: a web server to map and explore chemico-biological space. *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **26**(9), 995-1003.

Cortés-Cabrera, A., Klett, J., G. Dos Santos, H., Perona, A., Gil-Redondo, R., Francis, S.M., Priego, E.V., Gago, F. and Morreale, F. (2012) CRDOCK: An Ultrafast Multipurpose Protein-Ligand Docking Tool. *J. Chem. Inf. Model.*, **52**, 2300-2309.

Romero, O., Filice, M., de las Rivas, B., Carrasco-Lopez, C., Klett, J., Morreale, A., Hermoso, J.A., Guisan, J.M., Abian, O. and Palomo, J.M. (2012) Semisynthetic peptide-lipase conjugates for improved biotransformations. *Chem. Commun.*, **48**, 9053-9055.

Klett, J., Núñez-Salgado, A., G. Dos Santos, H., Cortés-Cabrera, A., Perona, A., Gil-Redondo, R., Abia, D., Gago, F. and Morreale, A. (2012) MM-ISMMA: an ultrafast and accurate scoring function for protein-protein docking. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3395-3408.

Lorente, E., Infantes, S., Abia, D., Barnea, E., Beer, I., García, R., Lasala, F., Jiménez, M., Mir, C., Morreale, A., Admon, A. and López D. (2012) A viral, TAP-independent, high affinity ligand with alternative interactions endogenously presented by the non-classical HLA-E class I molecule. *J. Biol. Chem.*, **287**, 34895-34903.

Ruiz, F.M., Francis, S.M., Tintoré, M., Ferreira, R., Gil-Redondo, R., Morreale, A., Ortiz, A.R., Eritja, R. and Fábrega, C. (2012) Receptor-based virtual screening and biological characterization of human apurinic/aprimidinic endonuclease (Ape1) inhibitors. *ChemMedChem*, **7**, 2168-2178.

Morreale, A. and Gago, F. (2012) COMparative BINDing Energy (COMBINE) Analysis as a Structure-Based 3D-QSAR Method. In: Physico-Chemical and Computational Approaches to Drug Discovery. RSC Drug Discovery Series, **23**, pp. 244-272.

Otras actividades / Other activities

Organización del congreso "The emerging dynamics view of proteins: Protein plasticity in allostery, evolution and self-assembly", Dresden, Germany, julio 2012, organizadores: U. Bastolla, M. Porto and H.E. Roman.

Editor del número especial de la revista Biophysica and Biochimica Acta (Elsevier) dedicada al congreso "The emerging dynamics view of proteins" (U. Bastolla)

Editor de la revista Peer J. (U. Bastolla)

Comité científico de las Jornadas de Bioinformática 2012 (U. Bastolla, A. Morreale)

Coordinador del curso de bioinformática del Master de Biofísica UAM (A. Pascual-García). Clases de bioinformática en el master de biofísica UAM (D. Abia, U. Bastolla, A. Cortés, J. Klett, R. Méndez, A. Morreale, A. Pascual-García), seminario en el master de bioinformática UCM (U. Bastolla)

Curso 2011-2012 de Sistemas Biológicos en el grado de Ingeniería Biomédica de la Universidad Carlos III de Madrid (U. Bastolla).

Solicitud de patente: F. Mayor-Menéndez, C. Murga-Montesinos, P.M. Campos-Muelas, J.J. Heijnen, A.M. Agnes, A. Kavelaars, A. Morreale y R. Gil. Nuevos compuestos inhibidores de p38MAPK y sus aplicaciones. N. de solicitud P201131754, 2 de noviembre de 2011. Propietario: UAM.

Organización del taller práctico "Docking y cribado virtual: uso de herramientas computacionales en el diseño de fármacos". 20-22 de junio de 2011, Madrid (A. Morreale)

Presentaciones orales en congresos:

U. Bastolla, Characterization of conformation changes in proteins with the torsional network model. Workshop "Allosteric Regulation of Cell Signalling", CNIO, Madrid, 17-19 September 2012.

U. Bastolla, Modeling the mutual influence between folding and evolution. Workshop: Modeling protein structural and energetic constraints on sequence evolution. Durham, USA, Nov. 2011

U. Bastolla, Contact interactions in proteins: Simple models give analytic insights on protein stability, evolution, and dynamics. Barcelona Supercomputing Center, Dec. 2011

A. Pascual-García, Detecting bacterial interactions from environmental samples: Ecological aggregations favor bacterial cosmopolitanism. Jornadas de Bioinformática 2012, Barcelona.

A. Morreale, A reverse combination of structure-based and ligand-based strategies for virtual screening. Jornadas de Bioinformática 2012, Barcelona.

GRUPO DE MODELADO MOLECULAR

MOLECULAR MODELLING GROUP



Jefe de Proyecto / Project Leader:
Paulino Gómez-Puertas

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Jesús Mendieta Gómez
Eduardo López-Viñas
Jan Jacob Wesselink

Estudiantes Predoctorales /
Graduate Students:
Fernando Martín García
Jesús Ignacio Mendieta Moreno
Íñigo Marcos Alcalde

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
David García Aristegui
Silvia Lusa Bernal

Resumen de investigación

El Grupo de Modelado Molecular (<http://www.cbm.uam.es/bioweb>) utiliza métodos de biología computacional para la integración de información evolutiva y estructural en nuestro conocimiento actual de los procesos biológicos.

Proyectos actuales de Investigación:

1.- Desarrollo de un nuevo sistema "in silico" de diseño de fármacos basado en las propiedades de la molécula receptora. Proyecto desarrollado en el marco de un contrato de I+D entre Biomol-Informatics (PCM) y la Fundación "Severo Ochoa". Incluye la investigación en la siguientes áreas:

1A.- Simulación mediante dinámica molecular de los procesos de polimerización y despolimerización de la proteína bacteriana FtsZ: diseño "in silico" de inhibidores como futuros antibacterianos. Proyecto en cooperación con el CNB-CSIC, IdiPaz y Biomol-Informatics en el marco de "Divinocell", un Proyecto Europeo del 7PM-UE.

1B.- Bioinformática del Síndrome de Cornelia de Langue (CdLS). Análisis de secuencias de exoma humano y eventos de splicing alternativo, así como simulación por dinámica molecular de las proteínas del anillo de Cohesinas. Proyecto en cooperación con la Universidad de Zaragoza.

1C.- Modelos bioinformáticos de la enzima Carnitina Palmitoiltransferasa I y su relación con obesidad y secreción de insulina: diseño in silico de fármacos anti-obesidad. Proyecto en cooperación con la Universidad de Barcelona y el IQFR-CSIC.

1D.- Simulación del mecanismo enzimático de GTPasas y ATPasas utilizando una interfaz Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular. Implementación de la Teoría de Funcionales de Densidad (DFT). Proyecto en cooperación con el Departamento de Física Teórica de la Materia Condensada de la UAM.

2.- Desarrollo de herramientas para el análisis de datos de secuencias genómicas de proyectos de NGS, incluyendo genomas completos y resecuenciación dirigida (p.e. exoma humano en la búsqueda de variantes ligadas a enfermedades genéticas o cáncer), ensamblaje de genomas procariotas y eucariotas secuenciados de novo, análisis de transcriptomas y estudios meta-genómicos y evolutivos. Proyecto en cooperación con el PCM, IdiPAZ y Biomol-Informatics.

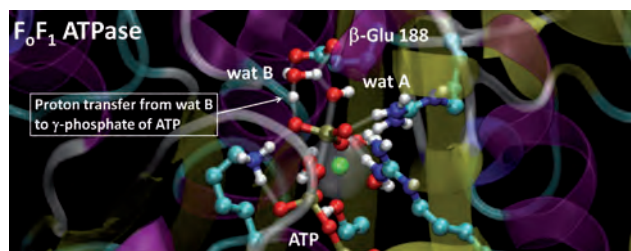


Figura 1. Interfaz Mecánica Cuántica / Mecánica Molecular: video mostrando el salto de un protón de la molécula de agua A a la molécula de agua B y de ahí al ATP en el centro activo de la proteína FoF1-ATPase.

Figure 1. Quantum Mechanics / Molecular Mechanics interface: proton movements from water molecule A to water molecule B and then to ATP in the active centre of the protein FoF1-ATPase.

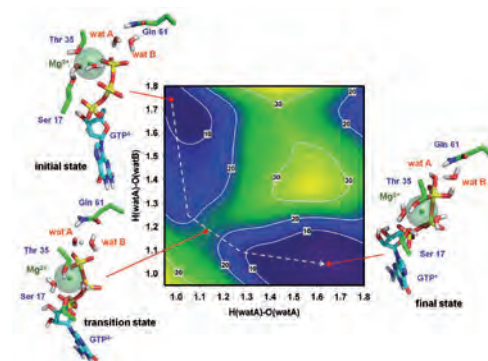


Figura 2. Mapa de energía libre, obtenido mediante QM/MM, para la transferencia de protones a través de dos moléculas de agua hacia la molécula de GTP en el centro activo de la proteína del oncogén Ras humano.

Figure 2. Free energy landscape, constructed using QM/MM, for the proton transfer through two water molecule toward the GTP molecule in the active centre of the protein of human oncogene Ras.

Research summary

The Molecular Modelling Group (<http://www.cbm.uam.es/bioweb>) uses the methods of computational biology to fully integrate evolutive and structural information into our existing knowledge and understanding of biology.

Current Research Projects:

1.- Development of a novel “in silico” drug design system based on the properties of receptor molecules. This project is developed in the framework of an R&D contract between Biomol-Informatics (Madrid Science Park) and the Fundación “Severo Ochoa”. This includes research in the following areas:

1A.- Molecular dynamics simulation of polymerization and depolymerization processes of the bacterial septum protein FtsZ. In silico design of specific inhibitors to be used as antibacterial drugs. Project in collaboration with CNB-CSIC, the Institute for Health Research of La Paz University Hospital (IdiPAZ) and Biomol-Informatics in the framework of the 7FP-EU Project Divinocell.

1B.- Bioinformatics approaches to Cornelia de Lange Syndrome (CdLS), including the analysis of human exome sequencing data and alternative splicing events, as well as molecular dynamics simulations of cohesin ring proteins. Project in collaboration with the University of Zaragoza.

1C.- Bioinformatic modeling of the Carnitine Palmitoyltransferase I enzyme and its relationship to obesity and insulin secretion: in silico design of anti-obesity drugs. Project in collaboration with the University of Barcelona and the IQFR-CSIC.

1D.- Simulations of the enzymatic mechanism of GTPases and ATPases using a hybrid Quantum Mechanics/Molecular Mechanics interface. Implementation of Density Functional Theory (DFT). Project in cooperation with the Department of Theoretical Condensed Matter Physics of the Autonomous University of Madrid.

2.- Development of tools and data pipelines for the analysis of genome sequences from NGS projects, including whole genome sequencing, targeted re-sequencing (i.e. human exome, searching for variants associated with genetic diseases or cancer), assembly of de novo sequenced prokaryotic and eukaryotic genomes, transcriptome analysis, as well as metagenomic and evolutionary studies. Project in cooperation with PCM, IdiPAZ and Biomol-Informatics.

Publicaciones / Publications

Wesselink, J.J., López-Camacho, E., De la Peña, S., Ramos-Ruiz, R., Ruiz-Carrascoso, G., Lusa-Bernal, S., Fernández-Soria, V., Gómez-Gil, R., *Gómez-Puertas, P. & *Mingorance, J. (*Corresponding authors). (2012). Genome sequence of OXA-48 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* KpO3210. *Journal of Bacteriology* **194**, 6981.

Arnedo, M., Menao, S., Puisac, B., Teresa-Rodrigo, M., Gil-Rodríguez, M., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Casals, N., Casale, C.H., Hegardt, F.G. & Pie, J. (2012). Characterization of a novel HMG-CoA Lyase enzyme with a dual location in endoplasmic reticulum and cytosol. *Journal of Lipid Research* **53**, 2046-2056.

Ahijado-Guzmán, R., Gómez-Puertas, P., Álvarez-Puebla, R.A., Rivas, G. & Liz-Marzán, L.M. (2012). SERS-based detection of the interactions between the essential cell division FtsZ protein and bacterial membrane elements. *ACS Nano* **6**, 7514-7520.

González-Magaldi, M., Postigo, R., de la Torre, B.G., Vieira, Y.A., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Andreu, D., Kremer, L., Rosas, M.F. & Sobrino, F. (2012). Mutations that hamper dimerization of foot-and-mouth disease virus 3A protein are detrimental for infectivity. *Journal of Virology* **86**, 11013-11023.

Mendieta, J., Pérez-Lago, L., Salas, M., & Camacho A. (2012). Functional Specificity of a Protein-DNA Complex Mediated by Two Arginines Bound to the Minor Groove. *Journal of Bacteriology* **194**, 4727-35.

Matos, R.G., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P. & Arraiano, C.M. (2012). The only exonuclease present in *Haloferax volcanii* has a unique response to temperature changes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1820**, 1543-1552.

Martín-García, F., Salvarelli, E., Mendieta-Moreno, J.I., Vicente, M., Mingorance, J., Mendieta, J. & Gómez-Puertas, P. (2012). Molecular dynamics simulation of GTPase activity in polymers of the cell division protein FtsZ. *FEBS Letters* **586**, 1236-1239.

Martín-García, F., Mendieta-Moreno, J.I., Mendieta, J. & Gómez-Puertas, P. (2012). Molecular dynamics analysis of conformational change of paramyxovirus F protein during the initial steps of membrane fusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **420**, 42-47.

Martín-García, F., Mendieta-Moreno, J.I., López-Viñas, E., *Gómez-Puertas, P. & *Mendieta, J. (* Co-last authors) (2012). The Role of Gln(61) in HRas GTP Hydrolysis: A Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Study. *Biophysical Journal* **102**, 152-157.

Puisac, B., Ramos, M., Arnedo, M., Menao, S., Gil-Rodríguez, M.C., Teresa-Rodrigo, M.E., Pié, A., de Karam, J.C., Wesselink, J.J., Giménez, I., Ramos, F.J., Casals, N., Gómez-Puertas, P., Hegardt, F.G. & Pié, J. (2012). Characterization of splice variants of the genes encoding human mitochondrial HMG-CoA lyase and HMG-CoA synthase, the main enzymes of the ketogenesis pathway. *Molecular Biology Reports* **39**, 4777-4785.

López, E., Wesselink, J.J., López, I., Mendieta, J., *Gómez-Puertas, P. & *Muñoz, S.R. (* Co-last authors) (2011). Technical phosphoproteomic and bioinformatic tools useful in cancer research. *Journal of Clinical Bioinformatics* **1**, 26.

Kisic, M., Matamoros, T., Nevot, M., Mendieta, J., Martínez-Picado, J., Martínez, M.A. & Menéndez-Arias, L. (2011). Thymidine analogue excision and discrimination modulated by mutational complexes including single amino acid deletions of Asp-67 or Thr-69 in HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 20615-20624.

Matos, R.G., Barbas, A., Gómez-Puertas, P. & Arraiano, C.M. (2011). Swapping the domains of exonuclease RNase II and RNase R: conferring upon RNase II the ability to degrade dsRNA. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **79**, 1853-1867.

Oroz, J., Valbuena, A., Vera, A.M., Mendieta, J., Gómez-Puertas, P. & Carrión-Vázquez M. (2011). Nanomechanics of the cadherin ectodomain: ‘canalization’ by Ca²⁺ binding results in a new mechanical element. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 9405-9418.

López, E., Matthiesen, R., Mendieta, J., Wesselink, J.J., Gómez-Puertas, P. & Ferreira, A. (2011). Functional phosphoproteomics tools for current immunological disorders research. *Journal of Integrated -OMICS* **1**, 1-16.

Hurtado, C., Bustos, M.J., Granja, A.G., de León, P., Sabina, P., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Revilla, Y. & Carrascosa, A.L. (2011). The African swine fever virus lectin EP153R modulates the surface membrane expression of MHC class I antigens. *Archives of Virology* **156**, 219-234.

Otras actividades / Other activities

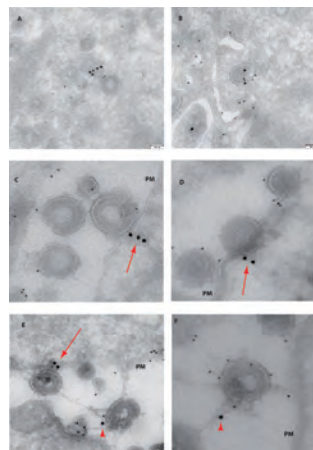
(ESP) El Grupo de Modelado Molecular ha participado en 7 cursos de especialización para Posgraduados en Bioinformática y ha participado en el Ciclo de Conferencias de Divulgación “COMBACT” para estudiantes de Educación Secundaria. El Grupo de Modelado Molecular coordina un contrato de Investigación y Desarrollo entre la compañía Biomol-Informatics SL (Parque Científico de Madrid) y la Fundación “Severo Ochoa” (2008-2014). Miembros del grupo participan como IP en los proyectos del 7PM-UE: Divinocell, Dorian y EpiTraits (Marie Curie-ITN).

The Molecular Modelling Group has participated in 7 postgraduate specialization courses. Has participated in the popular science conferences “COMBACT” for secondary school students. The Molecular Modelling Group leads a contract for Research and Development between the company Biomol-Informatics SL (Scientific Park of Madrid) and Fundación “Severo Ochoa” (2008-2014). Members of the group participate as PI in the 7FP-EU projects: Divinocell, Dorian and EpiTraits (Marie Curie-ITN).



178

Departamento de Cultura Científica
Science and Society Department
José Antonio López Guerrero





CULTURA CIENTÍFICA

Science and Society



DEPARTAMENTO DE CULTURA CIENTÍFICA

SCIENCE AND SOCIETY DEPARTMENT



Director / Director:
José Antonio López Guerrero

Secretaria Técnica /
Technical Secretary:
Almudena Hernando Bellido

Personal Científico /
Scientific Staff:
Raquel Bello-Morales Arroyo

Estudiantes Predoctorales /
Graduate Students:
Antonio Jesús Crespillo Alguacil

www.uam.es/ja.lopez

Premio Blog 2012 Comunidad de Madrid.
Blog Award 2012 Community of Madrid.

Resumen de investigación

Dentro del programa de Divulgación y Fomento de la Cultura Científica del CBMSO he participado en las siguientes actividades (2011-12): 1) XI (2011) y XII (2012) Semanas de la Ciencia de Madrid. Bajo mi dirección, el CBMSO ha participado con varios proyectos –como el concurso científico-literario “Escribe Con-Ciencia” (2011-2012)- que complementan al programa de visitas guiadas que se realiza a lo largo de todo el curso, destacándose, en este sentido, del resto de Centros del CSIC y UAM. 2) Colaboración con el programa Ciencia y Sociedad de Madri+d con la coordinación de un Blog científico-cultural (premiado en 2012 por la Comunidad de Madrid) y diversos suplementos en “Notiweb” (<http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad>). 3) Elaboración de la página institucional en Facebook y Twitter “Departamento de Cultura Científica. Centro de Biología Molecular”. Elaboración de una página semanal de difusión científica en la Web institucional (<http://www.cbm.uam.es/cccientifica/Enlaces.html>). 4) Programa semanal de cultura científica Mi+dTV y UNEDtv “Tres noticias en tres minutos en TV” (<http://www.madrimasd.org/informacionidi/madrimasd-tv/default.asp>). 5) Participación en diversos seminarios de divulgación científica en Institutos y Centros de Educación Secundaria. 6) Videoconferencias sobre temas científicos para centros de secundaria (2011). 7) Organización (2011-2012) del curso de biotecnología “Biotechnology Explorer” para profesores de secundaria. 8) Finalmente, como miembro del CBMSO, colaboro periódicamente en temas científicos y biotecnológicos con el suplemento “El Cultural”, la revista de cultura científica *Journal of Feelsynapsis*, con TVE (La 2), Radio Nacional de España (Radio 5 –“Entre Probetas”- y Radio 1 –“A Hombres de Gigantes”-), Radio Utopía, RadioSíntesis, Radio Círculo y Radio Alzheimer de la Fundación Alzheimer España.

Más información: <http://www.cbm.uam.es/cccientifica/Enlaces.html>

Por otra parte, en investigación, mi grupo está estudiando el papel de la infección por virus HSV-1 en neurodegeneración, desmielinización y transcitos en células oligodendrocíticas inmaduras o diferenciadas a células productoras de mielina, viendo el papel de moléculas como PLP o Rab27a en el proceso.



Figura 1. Cartel anunciador del concurso “Escribe Con-Ciencia”.

Figure 1. Poster of the “Escribe Con-Ciencia” scientific-literary competition”.

Research summary

Within the framework of the CBMSO Scientific Culture Program, I have collaborated in the following activities (2011-12): 1) XI (2011) and XII (2012) Scientific Weeks in Madrid. Under my coordination, several projects were carried out in the CBMSO, as the scientific-literary competition "Escribe Con-Ciencia", complementing our annual program of guided visits of Secondary School students to our Research Centre. The CBMSO is one of the most active Centres of the CSIC and UAM (Spanish Board of Scientific Research) in such tasks. 2) Collaboration with the Science and Society Madrid Programme, involving the management of a scientific and cultural Blog (awarded by the Autonomous Community of Madrid in 2012) and the providing of several information for the scientific e-diary "Notiweb". (<http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad>). 3) Developing of an Institutional Facebook and Twitter Website "Departamento de Cultura Científica. Centro de Biología Molecular" and a weekly-updated Institutional Website about Social Communication of Science (<http://www.cbm.uam.es/ccientifica/Enlaces.html>). 4) Weekly Mi+dTV and UNEDtv Scientific Culture Programme "3x3 TV news" (<http://www.madrimasd.org/informacionidi/madrimasd-tv/default.asp>). 5) Participation in several seminars in High Schools and Secondary School Centers. 6) Videoconferences on science for secondary schools (2011). 7) Organization (2011-2012) and coordination of the "Biotechnology Explorer" course for secondary school teachers. 8) Finally, as a CBMSO member, I collaborate periodically with the magazine "El Cultural", The Journal of Feelsynapsis – aimed to items of scientific culture –, the Spanish National TV (TVE; La 2), the Spanish National Radio (Radio 5 – "Entre Probetas"– and Radio 1 – "A Hombros de Gigantes"–), Radio Utopía, Radio Síntesis, Radio Círculo and Radio Alzheimer (Alzheimer España Foundation).

Further information: <http://www.cbm.uam.es/ccientifica/Enlaces.html>

Moreover, my investigation group aims at the study of the effect of HSV-1 on neurodegeneration, demyelinating disease and transcytosis in both immature and differentiated myelin-producing oligodendrocytic cells. The role of PLP or Rab27a molecules are being tackled as well.

Publicaciones / Publications

Bello-Morales, R., Crespillo, A.J., Fraile-Ramos, A., Tabarés, E., Alcina, A. and López-Guerrero J.A. (2012) "Role of the small GTPase Rab27a during Herpes simplex virus infection of oligodendrocytic cells". *BMC Microbiol.* **12**:265.

Bello-Morales, R., Pérez Hernández M., Rejas MT, Matesanz F., Alcina, A., and López-Guerrero, J.A. (2011). "Interaction of PLP with GFP-MAL2 in the Human Oligodendroglial Cell Line HOG". *PLoS One.* **6**:e19388.

López-Guerrero, J.A. (2012) "Ciencia en Grageas". Turpial ISBN: 978-84-95157-35-5.

López-Guerrero, J.A. (2011). "Virófagos: un escalón más en la complejidad evolutiva". *Virología*, **14**: 8.

López-Guerrero, J.A. (2011). "36th Annual International Herpesvirus Workshop". *Virología*, **14**: 23.

López-Guerrero, J.A. (2012). "Infecciones virales y neuropatologías asociadas". *Virología*, **15**: 50-58 (Review)

López-Guerrero, J.A. (2012). "37th Annual International Herpesvirus Workshop". *Virología*, **15**: 32.

López-Guerrero, J.A. (2011). "Breakthrough of the Year". *Journal of Feelsynapsis*, **3**: 42-51

Campos, E. and López-Guerrero, J.A. (2012). "Células madre: un futuro cada vez más cercano". *Journal of Feelsynapsis*, **6**: 99-104.

López-Guerrero, J.A. (2012). "Transgénicos". *Journal of Feelsynapsis*, **7**:120:124.

López-Guerrero, J.A. and Herradón, B. (2012). "Hitos científicos del 2012". *An. Quím.* **108**:376-380.

02/12/2011 "Terapias con diana. Varias investigaciones abren el camino hacia la medicina personalizada"

30/12/2011 "El LHC y la velocidad de los neutrinos. Lo mejor de 2011: Ciencia"

13/01/2012 "Idiomas contra el Alzheimer. Las enfermedades neurodegenerativas, abordadas desde el ámbito molecular"

30/03/2012 "La biotecnología se va a la prehistoria. El científico coreano Hwang Woo-Suk se dispone a clonar el mamut lanudo"

20/07/2012 "SIDA, ¿último asalto?"

28/12/2012 "El bosón de Higgs, el Proyecto Encode y los desafíos galácticos"

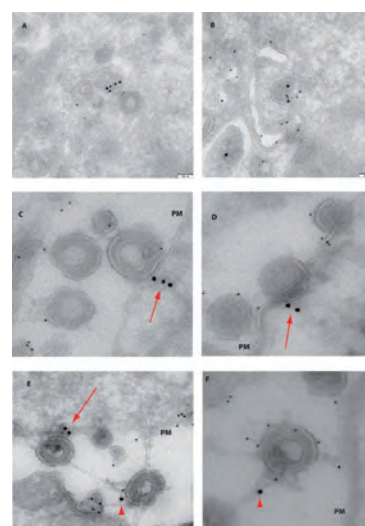


Figura 2. Infección de oligodendrocitos por HSV-1.

Figure 2. Infection of oligodendrocytes by HSV-1.

Otras actividades / Other activities

López-Guerrero, J.A. "El Cultural (<http://www.elcultural.es/>)":

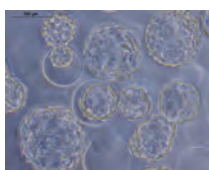
11/03/2011 "Un escéptico contra los espejismos más peligrosos que la superstición"

01/04/2011 "Un año para el Alzheimer. Varias líneas de investigación rastrean las claves de la enfermedad"

20/05/2011 "Virus contra virus. Una nueva especie de parásitos remueve la evolución"

27/09/2011 "Genética contra las enfermedades. La noche de los investigadores divulgará los hitos científicos más relevantes"

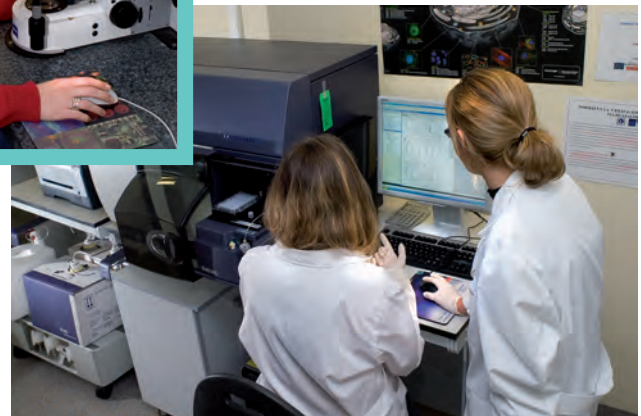
182	Animalario <i>Animal House Facility</i> Javier Palacín Urquijo
183	Servicio de Bioinformática <i>Bioinformatics Facility</i> David Abia Holgado
184	Servicio de Citometría de Flujo <i>Flow Cytometry Facility</i> Berta Raposo Ponce
185	Servicio de Fermentación <i>Fermentation Facility</i> Dionisio Ureña Rodríguez
186	Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva <i>Genomics and Massive Sequencing Facility</i> Fernando Carrasco Ramiro
187	Servicio de Microscopía Electrónica (SME) <i>Electron Microscopy Facility (SME)</i> María Teresa Rejas Marco
188	Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC) <i>Optical and Confocal Microscopy Facility (SMOC)</i> Carlos Sánchez Martín
189	Servicio de Química de Proteínas y Proteómica <i>Proteomics and Protein Chemistry Core Facility</i> Ana Isabel Marina Ramírez
190	Servicio de Transgénesis <i>Transgenesis Facility</i> M^a Belén Pintado Sanjuanbenito





SERVICIOS CIENTÍFICOS

Scientific Facilities



ANIMALARIO

ANIMAL HOUSE FACILITY



Director Técnico /
Technical Director:
Javier Palacín Urquijo

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. Antonio Alcamí Pertejo

Asesor Veterinario en Salud Animal/
Animal Health Veterinary Advisor
Dra. Elena Hevia Hernández

Personal / Personnel:
María Eugenia Vera Meneses
Miguel Ángel Bordallo Martín Fontecha
Miguel Ángel Cobeña Chivato
José María Sedano Torres
Marta González Mella
Fernando García Muñoz
Laura López Martínez

Personal cuidador:
Luis Zorrilla del Campo
Alfonso Gutiérrez García
Amanda Abad Serrano
Nuria Aceituno Bachiller
Álvaro Tardieu Chorro
Juan López Mellado
Milagros Sonseca García-Serrano
Dolores Núñez Sagredo
Virginia González de la Torre
Verónica Panero Martínez
Carolina Jima Torres

Descripción

El animalario del CBMSO es una instalación moderna que ocupa unos 1500 m². Dispone de una zona de barrera SPF para la producción de las más de 150 líneas de ratones transgénicos que producimos; una zona con un nivel de bioseguridad 3, para trabajar con ratones; dos zonas con nivel 2 de bioseguridad, una para ratón y otra para rata; una zona de estabulación convencional (para ratas, ratones y conejos); una instalación para animales acuáticos (peces y ranas); varias dependencias destinadas a administración y servicios, laboratorios, despachos, vestuarios, sala de control, etc.; una zona para el lavado, procesado y almacenaje de material; y una zona técnica, donde se encuentran los climatizadores y el resto de maquinaria que se encarga de mantener las condiciones ambientales óptimas para los animales.

Está registrado como centro usuario de animales de laboratorio con el número ES280790000180, y cumple con la legislación vigente en lo referente al bienestar animal, observación de su salud y formación del personal encargado de su cuidado y manipulación.

Description

The animal facility of the CBMSO is a modern facility which covers about 1,500 m². It has a clean zone or SPF barrier for the production of more than 150 lines of transgenic mice; an area with a Biosafety Level 3, to work with mice; two areas of biosafety Level 2, one for mice and one for rats; several rooms for standard housing of rats, mice and rabbits; a facility for aquatic animals, fish and frogs; some units designed for administration and services: laboratories, offices, dressing rooms, and a control room; areas for washing and material processing and storage of goods, and a technical area, which houses the air conditioners and other machinery that is responsible for maintaining the environmental conditions.

Its register number is ES280790000180, and we are committed to complying with the current regulations regarding animal welfare, observation of the animals' health and training the staff for their care and handling.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

Producción de animales de calidad.
Producción de líneas transgénicas de ratones.
Apoyo a los investigadores.
Asesoramiento técnico.
Controles sanitarios de los animales.
Posibilidad de trabajar en laboratorios de biocontención.
Formación para los investigadores y técnicos que empiezan a trabajar con animales.
Enriquecimiento ambiental para todos los animales alojados.

SERVICES

*Production of quality laboratory animals.
Production of transgenic mice.
Technician Support for the researchers.
Veterinary care for laboratory animals.
Health monitoring reports of rats and mice.
Possibility to work under biocontainment level 2 conditions.
Possibility to work under biocontainment level 3 conditions.
Education for persons involved in animal experiments.
Environmental enrichment for the laboratory animals.*

SERVICIO DE BIOINFORMÁTICA

BIOINFORMATICS FACILITY

Director Técnico /
Technical Director:

David Abia Holgado

Supervisor Científico /

Scientific Supervisor:

Dr. Ugo Bastolla Bufalini

Personal / Personnel:

David Abia Holgado

Ramón Peiró Pastor

Antonio Morreale

Página Web / Web page:

http://www2.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/plt_Servicio.aspx?IdServicio=4



Descripción

El Servicio de Bioinformática da soporte a los grupos de investigación del CBM realizando análisis bioinformáticos, asesorando sobre los aspectos computacionales de los proyectos de investigación, organizando cursos, y administrando los recursos informáticos tanto de hardware como de software.

Equipamiento: dos PCs reservados para los usuarios que quieran realizar análisis con el asesoramiento de los técnicos del servicio, 5 servidores de cálculo (de doble procesador quad core y 24GB de RAM), un sistema de almacenamiento con una capacidad de 20TB y un servidor con el interfaz Galaxy para realizar análisis de secuenciación masiva y ensamblaje de genomas.

Cursos: Hemos organizado cursos sobre la visualización y el análisis de las estructuras de proteínas, la cristalografía de proteínas, el uso del servidor de Galaxy y, en colaboración con el Servicio de Genómica, la base de datos de Ensembl y el almacenamiento de datos de secuenciación masiva en el EMBL, impartidos por expertos del EMBL.

Description

The Bioinformatics facility supports research groups at the CBMSO by (a) performing bioinformatics analysis, (b) advising on the computational aspects of research projects, (c) offering courses on basic and advanced bioinformatics tools and (d) managing the hardware and software of common usage.

Equipment: two PCs reserved for users willing to perform their analysis with our assistance, five high performance computation servers with dual quad core processor and 24GB of RAM, one shared parallel file system with 20 Terabytes capacity for storing data from NGS experiments, one server supporting the Galaxy suite (an interface to tools for the analysis of NGS data).

Courses: We organized courses on bioinformatics, including protein structure visualization and analysis, on protein crystallography, on the use of the Galaxy suite, and, in collaboration with the Genomic facility, one course on the Ensembl database given by an expert trainee from the European Bioinformatics Institute.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

Análisis de estructura de proteínas:

- Búsqueda de proteínas similares en secuencia o estructura a la proteína problema.

- Modelado por homología de estructura de proteínas.

- Predicción de la estabilidad estructural de proteínas.

- Caracterización de los cambios conformacionales y estimación de las barreras energéticas mediante el análisis de modos normales.

- Estudio de la evolución molecular de familias de proteínas, usando información de secuencia y estructura.

- Modelado de las interacciones proteína-proteína y proteína-ligando, mediante docking y simulaciones de dinámica molecular.

- Búsqueda de posibles inhibidores de una proteína problema mediante cribado virtual de quimiotecas.

Secuenciación masiva:

Este es un campo nuevo para el servicio, con grandes requerimientos computacionales y de almacenamiento. El abanico de análisis posibles es muy amplio y las herramientas informáticas no están todavía maduras. Por estas razones, los grupos experimentales deben estar implicados en el análisis para comprobar a posteriori la fiabilidad de los resultados obtenidos y su consistencia con resultados experimentales conocidos. Nuestro planteamiento consiste en entrenar a los usuarios en el análisis de sus datos utilizando el servidor Galaxy con el apoyo del personal del Servicio.

Los proyectos en los que hemos trabajado incluyen análisis de datos de RNA-seq (4), Chip-Seq (1), ensamblado de novo de genomas bacterianos (1), detección de polimorfismos (1) y análisis de secuencias repetitivas (1).

Particularmente importante ha sido la puesta en marcha del servidor de Galaxy con su colección de programas subyacentes y bases de datos de secuencias para el análisis de datos de secuenciación masiva.

SERVICES

Protein structure analysis:

- Identification of proteins related in sequence or structure with a query protein.

- Homology modelling of protein structures. For this item and the next ones we use both standard methods and methods developed by our research group.

- Prediction of protein folding stability for proteins with known or easily modelable structure.

- Characterization of conformation changes and their estimated free energy barriers through normal mode analysis.

- Study of the molecular evolution of protein families, combining structural information and sequence information, and reconstruction of phylogenetic trees.

- Modelling molecular interactions between a protein of known structure and a small molecule (candidate drug) or another protein, using docking techniques and molecular dynamics simulations, and quantitatively predicting their affinity.

- Virtual screening of large libraries of chemical compounds, in order to identify candidate drugs that are able to interact with the target protein.

Next generation sequencing: ww

This is a new field with high computational requirements for storing and analysing data. There is a huge variety of possible analysis and the bioinformatics techniques are not yet mature. For these reasons, experimentalists must be involved in the analysis, and propose tests to assess a posteriori the reliability of the bioinformatics analysis and evaluating its consistency with other experimental results. Our experience in the field of NGS is that it is most efficient to train the users to perform bioinformatics analysis on their own using the Galaxy suite, while the personnel of the facility provides advice, maintains the software or develops new one, and helps with the statistical analysis. The kind of projects at which we have been working include RNA-seq (4), ChIP-Seq (1), de-novo assembly of bacterial genomes (1), detection of polymorphisms (1) and analysis of repetitive sequences (1). Particularly important was the installation and updating of the Galaxy suite, its databases and its collection of programs for the analysis of massive sequencing data.

CITOMETRÍA DE FLUJO

FLOW CYTOMETRY FACILITY



Director Técnico /
Technical Director:
Dra. Berta Raposo Ponce

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dra. María Luisa Toribio

Personal / Personnel:
Dra. Berta Raposo Ponce
Silvia Andrade Calvo
Aitana Polo Rivas

Página Web / Web page:
http://www.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/pla_Servicio.aspx?IdServicio=5

Descripción

El Servicio provee de instrumentación y asistencia técnica a los investigadores del CBMSO para realizar análisis inmunofenotípicos y funcionales utilizando diversos parámetros celulares mediante técnicas de citometría de flujo. El servicio también realiza separaciones celulares ("cell sorting") basadas en parámetros de fluorescencia. En el servicio funcionan dos citómetros analógicos de dos láseres y cuatro detectores de fluorescencia (FACScalibur), un citómetro digital de tres láseres y ocho detectores de fluorescencia (FACSCanto II), y un separador celular de tres láseres y seis detectores de fluorescencia (FACSVantage SE), todos ellos de la compañía Becton Dickinson. El análisis de los datos obtenidos puede realizarse en el servicio utilizando tres ordenadores de análisis: un PowerMac G5 y un PowerMac G4, ambos equipados con licencias de los programas "FlowJo" (versión 6.4.1) y "CellQuestPro", y un PC equipado con una licencia de "FACSDiva" (versión 6.1.2) y una de "FlowJo" (versión 7.6.1).

Description

The flow cytometry facility provides instrumentation and technical assistance to carry out immunophenotype analysis and other studies of cellular processes using flow cytometry techniques. We also made cell-sorting experiments based on fluorescence parameters. The equipments available in the service (Becton Dickinson) are two analogical cytometers with two lasers and four detectors (FACScalibur), one digital cytometer with three lasers and eight fluorescence detectors (FACSCanto II) and one cell sorter with three lasers and six detectors (FACSVantage SE). Data analysis can be carried out at the service using PowerMac G5 and PowerMac G4 running "FlowJo" (version 6.4.1) and "CellQuestPro" software, and one PC computer running "FACSDiva" (version 6.1.2) and "FlowJo" (version 7.6.1) software.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

1. Mantenimiento y calibración de los equipos del Servicio.
2. Gestión del control de uso de los equipos, contabilidad y facturación.
3. Cursos de formación y supervisión sobre el uso de los equipos de citometría analítica.
4. Mantenimiento y distribución de reactivos de uso común en citometría de flujo.
5. Soporte en adquisición de muestras en FACScalibur y FACSCanto.
6. Soporte en análisis de los resultados con diferentes programas especializados.
7. Separación de subpoblaciones celulares en FACSVantage.

SERVICES

1. Maintenance and calibration of equipments.
2. Administrative duties.
3. Training courses and supervision on analytical flow cytometry.
4. Maintenance of stocks and distribution of reagents for flow cytometry.
5. Training in sample acquisition in FACScalibur and FACSCanto equipments.
6. Training in the analysis of results with different specialized software.
7. Separations of cell populations by cell sorting (FACSVantage).

SERVICIO DE FERMENTACIÓN

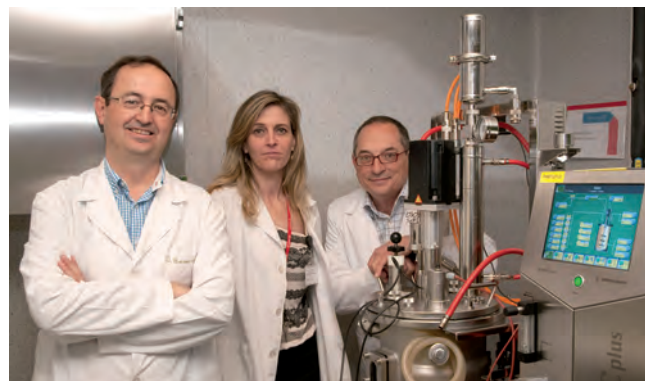
FERMENTATION FACILITY

Director Técnico /
Technical Director:
Dionisio Ureña Rodríguez

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. José Berenguer Carlos

Personal / *Personnel:*
María Isabel Carrascal Blanco

Estudiante en prácticas
Student: María Rioja Martínez
(30/1/12 - 15/6/12)



Descripción

El Servicio de Fermentación tiene dos tareas principales. Por un lado proporciona asesoramiento para la superproducción de proteínas heteróloga recalcitrantes y hace el "scale-up" de procesos de producción desde Erlenmeyer a fermentadores de la alta capacidad, incluido el marcaje con isótopos estables de la proteína expresada para análisis estructural. El Servicio también es usado por algunos grupos para el cultivo a gran escala de microorganismos no recombinantes. Por otro lado, el Servicio de Fermentación también proporciona preparaciones de células competentes de diferentes cepas de *E. coli* adecuadas para el clonaje de genes o expresión de proteínas recombinantes. También produce marcadores de peso molecular de DNA para su uso interno por la mayor parte de los grupos de investigación del CBMSO. Para estas tareas el Servicio dispone de instalaciones que cumplen los niveles de contención biológica P2, fermentadores de 4, 10 y 30 litros, así como el equipamiento necesario para la recolección y rotura de las células producidas.

Description

The Fermentation facility has two main tasks. On one hand it provides advice for the heterologous overproduction of recalcitrant recombinant proteins and does the scale up of a production process from Erlenmeyer to high capacity fermentors, and even for the labelling with stable isotopes of the expressed protein for structural analysis. This facility is also used by some groups for high-scale cultivation of non recombinant microorganisms. On the other hand, the fermentation facility also provides ready-to-use competent preparations of different strains of *E. coli* suitable for gene cloning or expression of recombinant proteins. It also produces DNA molecular weight markers for their internal use by most of the research groups in the CBMSO. For these tasks the Service has facilities that comply with levels of biological containment P2, fermenters of 4, 10 and 30 liters as well as the equipment necessary for the compilation and break of the produced cells.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

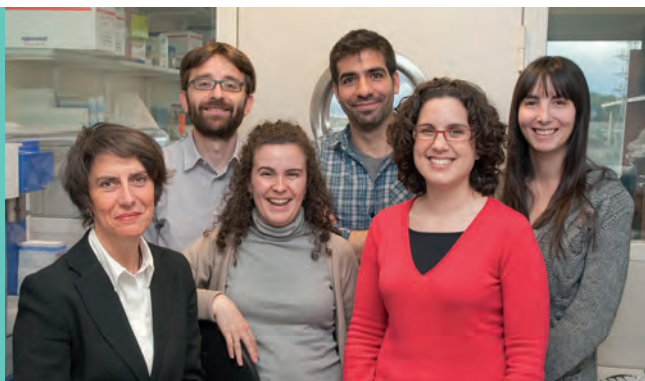
1. Fermentación a gran escala: Cultivo de microorganismos en fermentadores de 4 a 30 litros para producción de biomasa celular o proteínas recombinante.
2. Células Competentes: El Servicio ofrece alícuotas congeladas de células competentes preparadas por métodos químicos o listas para electroporación. Dispone de una colección de cepas de *E. coli* para clonaje y/o expresión de genes. Se proporciona asesoramiento en cuanto a la cepa adecuada para cada objetivo específico.
3. Marcadores de peso molecular de DNA: Alícuotas de DNA de los bacteriofagos $\phi 29$ o λ digerido con enzimas de restricción.
4. Expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*: Búsqueda de la cepa apropiada para la expresión y condiciones óptimas para la producción de proteínas recombinantes solubles.
5. Marcaje con isótopos estables: Se dispone de producción de proteínas recombinantes marcadas con ^{13}C y / o ^{15}N .
6. Rotura de células con prensa de French.

SERVICES

1. Large scale fermentation: Culture of microorganisms in 4 to 30-liter fermenters for the production of cell biomass or recombinant proteins.
2. Competent Cells: The facility offers frozen aliquots of competent cells prepared either chemically or ready for electroporation. A collection of *E. coli* strains is available for cloning and/or expression of genes. Advice is provided regarding the strain to be used for each specific purpose.
3. DNA Molecular Weight Markers: Aliquots of $\phi 29$ or λ DNA bacteriophages digested with restriction enzymes.
4. Heterologous protein expression in *E. coli*: Screening for appropriate expression strains and optimization for the production of soluble recombinant proteins.
5. Stable isotope labelling: Production of recombinant proteins labeled with ^{13}C and/ or ^{15}N is also available.
6. Disruption of cell cultures by French Press.

SERVICIO DE GENÓMICA Y SECUENCIACIÓN MASIVA

GENOMICS AND MASSIVE SEQUENCING FACILITY



Director Técnico /
Technical Director:
Fernando Carrasco Ramiro

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dra. Begoña Aguado Orea

Personal / Personnel:
Dra. Laura Tanera Moreno
Sandra Gonzalo Flores
Alberto Mudarra Rubio
Graciela Alonso Castro

Página Web / Web page:
<http://www.cbm.uam.es/genomica>

Descripción

El Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva es responsable de la implementación y desarrollo de tecnologías de biología molecular y genómica, y proporciona asesoramiento y supervisión técnica en estas tecnologías a los grupos de investigación. En particular, ofrece soporte técnico en el diseño experimental, la ejecución y el análisis de datos de experimentos de PCR y RT-PCR en tiempo real. Asimismo, como integrante activo de la Plataforma de Secuenciación Masiva de Cantoblanco, ofrece asesoría en el diseño experimental de proyectos de secuenciación masiva (NGS), media entre la Plataforma y el usuario en la entrega de muestras y datos y realiza el seguimiento de los proyectos que se realizan en dicha Plataforma. Actualmente proporciona también soporte técnico y análisis computacional de los datos experimentales procedentes de esta u otras plataformas NGS. Por último, el servicio organiza seminarios y cursos de formación para usuarios en las áreas de su competencia.

Description

The Genomics and Next-Generation Sequencing Facility is responsible for the implementation and development of molecular biology and genomic technologies and provides advice and technical supervision on these technologies to research groups. In particular, it offers technical support in the experimental design, undertaking, and data analysis of real-time PCR and RT-PCR experiments. Also, as an active partner of the Cantoblanco Massive Sequencing Platform, the facility offers advice on the experimental design for next-generation sequencing (NGS) technologies, mediates between the Platform and the users with samples and data and follows up the NGS projects. Currently it also provides with computational analysis of the data obtained from this and other platforms. In addition, the facility organizes seminars and courses for users in its areas of specialization.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

1. PCR y RT-PCR en tiempo real: diseño experimental, realización de experimentos y análisis de datos (robot de pipeteo Eppendorf epMotion 5075, equipos ABI 7900HT y Bio-Rad CFX384, software de análisis GenEx).
2. Secuenciación masiva: asesoría en solicitud de proyectos y diseño experimental (de novo, resecuenciación, RNA-seq, ChIP-seq, metagenómica, amplicones, ...etc.), mediación en entrega de muestras y datos, implicación en seguimiento del proyecto (plataformas Illumina y Roche-454).
3. Análisis computacional NGS: alineamientos, ensamblajes, estudios de expresión diferencial, diversidad biológica, ...etc., de datos procedentes de secuenciación masiva mediante diferentes paquetes de software (Bowtie, Velvet, SOAP, TopHat, Cufflinks, QIIME, ...etc.).
4. Uso de los espectrofotómetros "Nanodrop" (2 equipos).
5. Uso del extractor automático de ácidos nucleicos "Maxwell16 (Promega)".
6. Determinación de integridad de RNA en el equipo "Agilent bioanalyzer".
7. Uso de termocicladores convencionales (3 equipos).
8. Uso de termocicladores de tiempo real "Lightcycler" (3 equipos).
9. Uso de termociclador de tiempo real "ABI 7900HT".
10. Uso de los softwares "Pathway Studio" y "MedScan".

SERVICES

1. Real-time PCR and RT-PCR: experimental design, undertaking and analysis of experiments (Eppendorf epMotion 5075 LH pipetting robot, ABI 7900HT and Bio-Rad CFX384 instruments, GenEx analysis software).
2. Next-Generation Sequencing (NGS): advice on grant writing proposals, experimental design (de novo, resequencing, RNA-seq, ChIP-seq, metagenomics, amplicons, ...etc.), mediation in delivery of samples and data and follow-up of projects (Illumina and Roche-454 platforms).
3. NGS computational analysis: alignments, assemblies, differential expression studies, biological diversity, ...etc. of NGS data using different software packages (Bowtie, Velvet, SOAP, TopHat, Cufflinks, QIIME, ...etc.).
4. Use of the "Nanodrop" spectrophotometers (2 units).
5. Use of the "Maxwell16 (Promega)" automated nucleic acid extractor.
6. Determination of RNA integrity in the "Agilent bioanalyzer" equipment.
7. Use of conventional thermocyclers (3 units).
8. Use of "Lightcycler" real-time thermocyclers (3 units).
9. Use of "ABI 7900HT" real-time thermocycler.
10. Use of "Pathway Studio" and "MedScan Reader" softwares.

SERVICIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (SME)

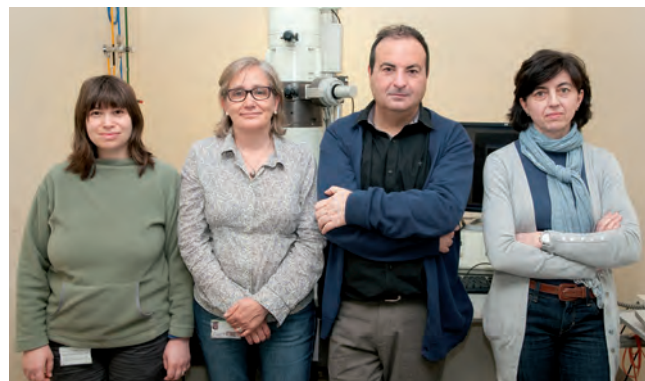
ELECTRON MICROSCOPY FACILITY (SME)

Director Técnico /
Technical Director:
Dra. María Teresa Rejas Marco

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. Germán Andrés Hernández

Personal / *Personnel:*
Milagros Guerra Rodriguez
María Luisa del Pozo
(hasta septiembre de 2011)
Lara Rodenstein
(desde septiembre de 2011)

Página Web / *Web page:*
http://www.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/plt_Servicio.aspx?IdServicio=20



Descripción

El Servicio de Microscopía Electrónica (SME) proporciona apoyo científico-técnico a los grupos de investigación interesados en emplear la microscopía electrónica para el análisis ultraestructural e inmunocitoquímico de complejos macromoleculares, virus, bacterias, células eucariotas y tejidos. Los métodos disponibles incluyen técnicas convencionales de procesamiento de muestras y criotécnicas como la criosustitución, la crioultramicrotoma y la criofractura. Además el SME ofrece diferentes métodos de localización in situ de ácidos nucleicos y proteínas, incluyendo técnicas de microscopía correlativa óptica-electrónica (CLEM) para la observación in vivo de moléculas de interés y su posterior localización ultraestructural. El SME dispone de un microscopio electrónico de transmisión de 100 kV equipado con una cámara fotográfica digital (4K x 4K) y de un microscopio invertido de fluorescencia dedicado a técnicas CLEM. Además dispone del siguiente equipamiento para el procesamiento de muestras: equipo de criofijación por inmersión, equipo de criosustitución automática, ultramicrotomo convencional, crioultramicrotomo y unidad de criosecado.

Description

The electron microscopy (EM) facility provides scientific and technical support to research teams interested in using transmission EM for ultrastructural and immunocytochemical analyses of macromolecular assemblies, viruses, bacteria, eukaryotic cells and tissues. Available methods for sample processing include conventional techniques and cryotechniques such as freeze-substitution, cryosectioning and freeze-etching. We also offer methods for in situ localization of nucleic acids and proteins, including correlative light-electron microscopy (CLEM) techniques that permit to integrate in vivo visualization and ultrastructural mapping of target molecules. The EM facility is equipped with a 100 kV transmission electron microscope equipped with a 4k x 4k camera and an inverted fluorescence microscope devoted to CLEM techniques. Also, our equipment includes the following instruments for sample processing: a plunge-freezing unit, an automatic freeze-substitution system, a conventional ultramicrotome and a cryoultramicrotome and a freeze-etching unit.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

1. Supervisión científico-técnica en el diseño experimental, análisis e interpretación de datos.
2. Formación y supervisión de los usuarios en el manejo del microscopio electrónico.
3. Mantenimiento, ajuste y manejo de los equipos.
4. Tinción negativa de complejos macromoleculares.
5. Inclusión convencional de muestras biológicas en resinas y ultramicrotoma.
6. Criosustitución e inclusión a baja temperatura.
7. Crioultramicrotomía (técnica de Tokuyasu).
8. Inmunomicroscopía electrónica con conjugados a oro coloidal.
9. Criofractura, criosecado y obtención de replicas de Pt-C.
10. Microscopía electrónica de ácidos nucleicos.
11. Microscopía correlativa óptica-electrónica.

SERVICES

1. Technical and scientific supervision on experimental design and data analysis.
2. Training and supervision of EM facility users.
3. Equipment maintenance, adjustment and management.
4. Negative staining of macromolecular specimens.
5. Conventional resin-embedding and ultrathin sectioning of biological specimens.
6. Freeze-substitution and embedding at low temperatures.
7. Tokuyasu's cryosectioning.
8. Immunoelectron microscopy with gold conjugates.
9. Freeze-fracture, freeze-etching and Pt-C replication.
10. Electron microscopy of nucleic acids.
11. Correlative light-electron microscopy.

SERVICIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y CONFOCAL (SMOC)

OPTICAL AND CONFOCAL MICROSCOPY FACILITY (SMOC)



Director Técnico /
Technical Director:
Dr. Carlos Sánchez Martín

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. Javier Díez Guerra

Personal / Personnel:
María Ángeles Muñoz Alcalá
Verónica Labrador Cantarero
Teresa Villalba Villacorta
Irene Martínez Carrasco

Página Web / Web page:
<http://www.cbm.uam.es/confocal>

Descripción

El SMOC fue creado en 1999, incluyendo un confocal Zeiss LSM310, dos confocales de BioRad, MicroRadiance y Radiance2000, y un microscopio de campo ancho Zeiss Axioskop. Actualmente disponemos de 6 Confocales, 3 de ellos con adquisición espectral, un Multifotón, 6 Microscopios de campo ancho, una Lupa, un Vibratomo y dos Estaciones de trabajo para procesamiento y deconvolución de imágenes. Tenemos sistemas de incubación y perfusión con control de temperatura, humedad y CO₂ en dos de los Confocales y tres de los Microscopios de campo ancho, permitiendo realizar estudios in vivo de larga duración. Distribuimos algunos marcadores fluorescentes, anticuerpos, medios de montaje y placas de cultivos necesarios para muchas de las aplicaciones en microscopía óptica. Nuestra función principal es intentar ofrecer las aplicaciones y tecnología demandadas por el personal científico del CBMSO por lo que no desarrollamos proyectos de investigación propios o colaboraciones científica aunque damos servicio a laboratorios pertenecientes a otros Institutos y Organismos de investigación.

Description

The SMOC facility was created in 1999 including one Zeiss LSM310 confocal, two BioRad ones, MicroRadiance and Radiance2000, and one Zeiss Axioskop widefield microscope. Nowadays, we have six Confocals, three of them with spectral acquisition, one Multiphoton, six Widefield microscopes, one Stereomicroscope, one Vibratome and two Workstations for image processing and deconvolution. Two of the Confocals and three of the Widefield microscopes have incubation chambers and perfusion systems for long-term in vivo experiments. We also distribute some antibodies, fluorescent markers, mounting media, glass and dishes which are typically used for microscopy applications. Our main purpose is to offer the applications and technology demanded by the CBMSO scientific staff. So, the SMOC facility does not carry out any scientific research though offer service to external groups of other Institutes and Organizations.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

1. Gestión y facturación de los servicios
2. Mantenimiento y supervisión del sistema de reservas de los equipos
3. Asistencia y formación de usuarios
4. Organización de seminario y desarrollo de guías y tutoriales
5. Mantenimiento de la página Web del SMOC (<http://www.cbm.uam.es/confocal>)
6. Distribución y mantenimiento del stock de reactivos
7. Participación activa en el desarrollo de la iniciativa de la Red Española de Microscopía Óptica Avanzada (REMOA) (<http://remoa.net>)

SERVICES

1. Facility management and invoicing
2. Equipment booking application supervision and maintenance
3. User training and assistance
4. Organization of seminars and development of tutorials and guides
5. Facility web page maintenance (<http://www.cbm.uam.es/confocal>)
6. Distribution and stock maintenance of reagents useful for optical microscopy applications
7. Active involvement in the organization of the Spanish Network of Advanced Optical Microscopy (REMOA) (<http://labs.remoa.net>)

SERVICIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS Y PROTEÓMICA

PROTEOMICS AND PROTEIN CHEMISTRY CORE FACILITY

Director Técnico /
Technical Director:
Dra. Ana Isabel Marina Ramírez

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. Fernando Rodríguez

Personal / *Personnel:*
Dr. Carlos García
Dra. Esperanza Morato
Dra. Mercedes del Valle
Inés Zapico

Página Web / *Web page:*
www.cbm.uam.es/servicios/proteomica.htm
y www.proteored.org



Descripción

En 1993 se creó el Servicio de Química de Proteínas en el CBMSO. La trayectoria del Servicio de Proteómica ha sido paralela a la evolución de la comunidad científica en el estudio de proteínas con el objetivo de proporcionar soporte y asesoramiento a los investigadores en los métodos apropiados para la preparación de la muestra y en el diseño del flujo de trabajo adecuado para cada proyecto. El laboratorio está equipado con sistemas de electroforesis 1D y 2D y con cuatro equipos de espectrometría de masas:

1. MALDI-TOF de Bruker
2. LCQ Deca-XP (Trampa 3D) de Thermo-Scientific
3. LTQ-VELOS (Dos trampas 2D en tandem) de Thermo-Scientific
4. LTQ-ORBITRAP-VELOS-PRO (Dos trampas 2D en tandem acopladas a un analizador Orbitrap) de Thermo-Scientific

Nuestro Servicio ha sido utilizado por numerosos proyectos de investigación en un rango amplio de áreas científicas.

Formación:

1. Cursos en Proteómica avanzada para el personal del Servicio.
2. Seminarios dirigidos a usuarios acerca de los avances recientes en instrumentación.
3. Participación en congresos de Proteómica nacionales e internacionales

PRESTACIONES DEL SERVICIO

1. Análisis de peso molecular de péptidos y proteínas.
2. Preparación de muestras.
3. Identificación de proteínas mediante mapeo peptídico (MALDI-TOF-MS).
4. Identificación de proteínas mediante LC-MS/MS (ESI-LTQ-ORBITRAP).
5. Caracterización de proteínas (análisis de modificaciones postraduccionales).
6. Secuenciación De novo.
7. Electroforesis 2D.

Description

In 1993 the Protein Chemistry Facility was created in the CBMSO. The trajectory of the Proteomics Facility has been parallel to the evolution of the scientific community in the study of proteins and its objectives are to provide technical support and advice to researchers on the appropriate methods of preparing samples and design of the appropriate work-flow for each project.

The laboratory is equipped with systems to run 1-D and 2-D electrophoresis and four mass spectrometers:

1. MALDI-TOF from Bruker.
2. LCQ Deca-XP (3D-Ion Trap) from Thermo-Scientific.
3. LTQ-VELOS (2D-Ion Trap in tandem) from Thermo-Scientific.
4. LTQ-ORBITRAP-VELOS-PRO (2D-Ion Trap in tandem coupled to Orbitrap analyzer) from Thermo-Scientific.

Our service has been used for numerous research projects in a broad range of scientific fields.

Training courses:

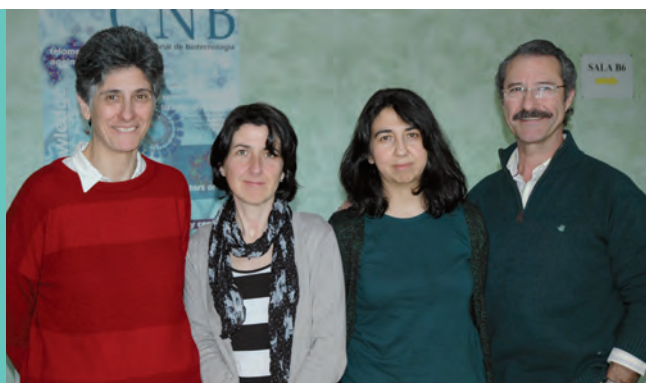
1. Training courses for staff in advanced proteomics.
2. Educational seminars for internal and external users on recent advances in instrumentation.
3. Participation in national and international congresses on proteomics.

SERVICES

1. Protein and peptide molecular weight analysis.
2. Sample preparation.
3. Protein identification by peptide mass fingerprinting (MALDI-TOF-MS).
4. Protein Identification by LC-MS/MS (ESI-LTQ-ORBITRAP).
5. Protein characterization (analysis of protein modifications).
6. De novo sequencing.
7. 2D electrophoresis.

SERVICIO DE TRANSGÉNESIS

TRANSGENESIS FACILITY



Director Técnico / *Technical Director:*
Dra. M^a Belén Pintado Sanjuanbenito CNB

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. Antonio Alcamí Pertejo CBMSO

Personal / *Personnel*

Alfredo Serrano Montalbo (Microinjection) CNB
Dra. Marta García Flores (Molecular Biology) CNB
Verónica Domínguez Plaza (ES cell technology) CBMSO

Descripción

La Unidad de Transgénesis CNB-CBMSO ofrece apoyo a grupos de investigación vinculados a la Plataforma científico-tecnológica Innotek, dentro del campus de excelencia CSIC-UAM en la generación, gestión e intercambio de líneas de ratones modificados genéticamente. Ofrecemos asesoramiento técnico y científico en el diseño de estrategias para generar el modelo deseado, ya sea por transgénesis aditiva o por mutagénesis dirigida (KO y KI). También facilitamos la incorporación de modelos generados por consorcios internacionales u otros grupos de investigación, cuando el estatus sanitario de éstos no cumple con los requerimientos de nuestros centros. Por último asesoramos en la gestión de las colonias de las diferentes líneas y en el diseño de los cruces necesarios para trabajar con el fondo genético más adecuado.

Description

The CNB-CBMSO Transgenesis Unit provides support to researchers linked to the Platform CSIC- UAM in the creation, establishment and interchange of genetically modified mouse models. The Unit offers technical and scientific advice on the best strategy to achieve the desired model, either by additive transgenesis or targeted mutagenesis (KO and KI). We also facilitate the incorporation of those models already available from international consortia or as a result of scientific interchange when health status of the original colony does not meet the requirements of our centers. In addition, support is provided for breeding schemes to ensure the more suitable genetic background.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

1. Asesoramiento en el diseño de vectores de targeting y construcciones para microinyectar
2. Microinyección pronuclear de DNA plasmídico, BACs y YACs
3. Electroporación de vectores en células ES de diferentes fondos genéticos
4. Inyección de Zinc Finger Nucleasas
5. Manipulación de Células ES generadas en consorcios internacionales
6. Microinyección o agregación de células ES para generar quimeras
7. Generación de células ES de ratón
8. Rederivación sanitaria mediante transferencia de embriones o fecundación in vitro
9. Purificación de ADN e identificación de fundadores por PCR
10. Técnicas de biología reproductiva para solucionar problemas de la gestión de ratones modificados genéticamente
11. Apoyo en el establecimiento y expansión de líneas de ratón genéticamente modificadas

Al mismo tiempo el personal de la Unidad compagina su actividad con trabajos de investigación que permitan incorporar nuevas técnicas o mejorar la eficiencia de las existentes. También se desarrolla una actividad docente especializada en tecnologías reproductivas a los usuarios que lo soliciten.

Lista de equipamiento especializado:

Dos equipos de microinyección con micromanipuladores hidráulicos, un femtojet y un piezo drill
Microscopios y lupas
Microforja y puller
Termociclador y equipamiento de electroforesis
Laboratorio equipado para el manejo de células ES

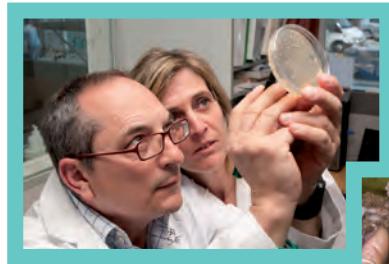
SERVICES

1. Advise in the design of target vectors or constructs for microinjection
2. Pronuclear microinjection of plasmidic, BAC or YAC DNA
3. Vector electroporation in R1 or G4 ES cell lines
4. Zinc finger nucleases injection
5. International consortia ES cells handling
6. ES cell injection or aggregation to generate chimeras
7. Derivation of murine ES cell lines
8. Embryo rederivation through IVF or embryo transfer
9. DNA purification and founder identification by PCR upon request
10. Reproductive biotechnology to solve breeding problems of genetically modified mice
11. Support in the creation, establishment and management of genetically altered mouse lines

These activities are combined with training and education on demand and applied research to develop and refine reproductive technologies in order to enhance transgenic production efficiency or colony management

Specialized Equipment List:

Two microinjection settings with hydraulic micromanipulation system and Eppendorf femtojet injector.
One electric microinjection setting with piezo drill
Dissecting microscopes.
Microforge and pipette puller
Termocyclator and electrophoresis equipment
Fully equipped laboratory for ES cells handling



Administración

Administration

Biblioteca

Library

Compras y Almacén

Purchase Department

Cultivos, Lavado y Esterilización

Cell Culture, Washing and Sterilization

Dirección

Management Board

Diseño Gráfico

Graphic Design

Fotografía

Photography

Gestión de personal

Personnel Management

Gerencia

Management

Informática

Computing

Instrumentación

Instruments and Equipment

Mantenimiento

Maintenance

Recepción

Reception

Relaciones Institucionales

Institutional Relations

Seguridad Biológica

Biological Security

Seguridad y Prevención en

Riesgos Laborales

Safety and Occupational Risk

Prevention



SERVICIOS GENERALES

General Services



ADMINISTRACIÓN
ADMINISTRATION

Jaime García Martín-Delgado
Carmen Arroyo Martín
Josefina Escribano Molina
Mercedes Herrador Morales
Jessica Martínez Santos
Pilar Nogal Paris
Miguel Pérez Pulido
Loreto Plaza Diago
Esteban Rueda Cubero
Belén Villar Pérez

BIBLIOTECA
LIBRARY

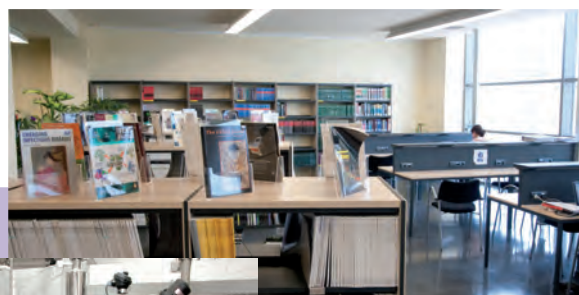
Rosario Gutiérrez García
Dunia Mairena Escribano

GESTIÓN DE PERSONAL
PERSONNEL MANAGEMENT

M^a Reyes Llaguno Pérez
Montserrat Cantarero García
Isabel de la Rosa Santos
José María Galán González
Pedro Alejandro Pérez García
Eva Torres Moreno

COMPRAS Y ALMACÉN
PURCHASE DEPARTMENT

M^a Carmen Rico Ruiz
José Miguel Celestén Martín
Margarita Corral Díaz
M^a José Fernández Martín
José Luis García Mira
Remedios Madrid del Álamo
Joaquín Parra García
Teodoro Pedraza Caro
Gilbert Staszkievicz Notario



GERENCIA
MANAGEMENT

Germán Lerma Rodrigo
Gloria Escribano Sánchez
Jesús Alfonso Maiz Delgado
Silvia Villalba García

INSTRUMENTACIÓN
INSTRUMENTS AND EQUIPMENT

Francisco Gutiérrez de la Cruz
Santiago Arenas Martínez
Juan A. Delgado Rodríguez
Jesús González Galán
José Luis Mejías Pozuelo
Fernando Muñoz Maqueda
Jesús Pozuelo Torrijos

MANTENIMIENTO
MAINTENANCE

Jose Antonio Muñoz Díez
Pedro Pablo Cordon Polanco
José A. Gago Sánchez
Juan Luis García Alarcón
Juan Carlos García Jiménez
Miguel González Díaz
David Hernández Pulido
Dominic López Irving
César Martos Valladares
Emilio Montero Mínguez
Carlos Quiñones de la Guía



RECEPCIÓN
RECEPTION

Manuel Barajas Marín
M^a Jesús Gil Marinas

CULTIVOS, LAVADO Y ESTERILIZACIÓN

CELL CULTURE, WASHING AND STERILIZATION

Mercedes Dávila Cerrato
Pilar Alonso Hernández
M^a Carmen Alonso Barba
M^a Ángeles Blanco Ferreras
Amparo Bobadilla Hidalgo
Juana Bustos Sánchez
María Cazorla Plaza
Antonia Cerrato Gómez
Anunciación Gaceo Esteban
Miriam García Carrascal
Alfonso Gutiérrez García
M^a Nieves Martín Bermejo
F. Borja Mirasol Burgos
Ana M^a Pérez Colmenar
Juan Antonio Rebelles Vicente
Víctor Ribas Camacho
Eva María Salgado
Antonio Tirado Morón

DIRECCIÓN

MANAGEMENT BOARD

Antonia Condes Cano

INFORMÁTICA

COMPUTING

Pedro Pemau Alonso
Carlos Aguado Camacho
Diego Díaz Rodilla
Fidel Díaz Rodríguez
Jorge César Montoya Valero
María Peña Pérez García
Santiago Soto-Largo Dimitrieff

DISEÑO GRÁFICO

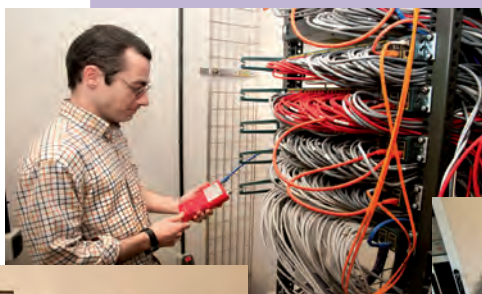
GRAPHIC DESIGN

José Ignacio Belio López

FOTOGRAFÍA

PHOTOGRAPHY

José Antonio Pérez Gracia



RELACIONES INSTITUCIONALES

INSTITUTIONAL RELATIONS

Mercedes Huete Pereda
Jessamyn Jackson

SEGURIDAD BIOLÓGICA

BIOLOGICAL SECURITY

Angeles Sánchez Sánchez
Gema Caparrós de la Jara
Carlos Jorquera Blanco
Silvia Medina Villar
M^a Cruz Valladares Bartolomé

SEGURIDAD Y PREVENCIÓN EN RIESGOS LABORALES

SAFETY AND OCCUPATIONAL RISK PREVENTION

Antonio Sánchez Moreno



- | | |
|-----|--|
| 198 | Lecciones Conmemorativas
<i>Memorial Lectures</i> |
| 199 | <div style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: red; margin-right: 5px;"></div> Ciclo de Seminarios “Severo Ochoa”
<i>Cycle “Severo Ochoa” Seminars</i> |
| 200 | <div style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> Seminarios del Centro
<i>CBMSO Seminars</i> |
| 202 | <div style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: yellow; margin-right: 5px;"></div> Seminarios AD-HOC
<i>AD-HOC Seminars</i> |



AULA RAMÓN ARECES

SEMINARIOS Y LECCIONES

Seminars and Lectures



El CBMSO disfruta de ayudas institucionales del Banco Santander y la Fundación Ramón Areces

LECCIONES CONMEMORATIVAS / MEMORIAL LECTURES



XII LECCIÓN CONMEMORATIVA ELADIO VIÑUELA 2011

XII ELADIO VIÑUELA MEMORIAL LECTURE 2011

Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
29 marzo 2011	Peter Palese	Mount Sinai School of Medicine, New York, USA	Pandemic Influenza Viruses: Past and Future



XIII LECCIÓN CONMEMORATIVA ELADIO VIÑUELA 2012

XIII ELADIO VIÑUELA MEMORIAL LECTURE 2012

Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
16 marzo 2012	Carlos Bustamante	University of California, Berkeley, CA. USA	Grabbing the Cat by the Tail: Discrete Steps and Inter-Subunit Coordination by a DNA Packaging Ring-ATPase



XVIII LECCIÓN CONMEMORATIVA SEVERO OCHOA 2011

XVIII SEVERO OCHOA MEMORIAL LECTURE 2011

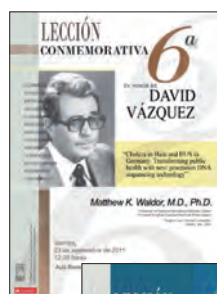
Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
11 noviembre 2011	Ari Helenius	Institut F. Biochemie Zürich, Switzerland	A systems approach to virus entry



XIX LECCIÓN CONMEMORATIVA SEVERO OCHOA 2012

XIX SEVERO OCHOA MEMORIAL LECTURE 2012

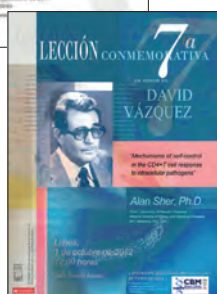
Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
28 noviembre 2012	Thomas Steitz PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2009	Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven, USA	Structural basis of Crick's Central Dogma



VI LECCIÓN CONMEMORATIVA DAVID VÁZQUEZ 2011

VI DAVID VÁZQUEZ MEMORIAL LECTURE 2011

Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
23 septiembre 2011	Matthew K. Waldor	Howard Huges Medical Institute Investigator Brigham and Women's Hospital Boston, MA, USA	Cholera in Haiti and HUS in Germany: Transforming public health with next generation DNA sequencing technology



VII LECCIÓN CONMEMORATIVA DAVID VÁZQUEZ 2012

VII DAVID VÁZQUEZ MEMORIAL LECTURE 2012

Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
1 octubre 2012	Alan Sher	National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD, USA	Mechanisms of self-control in the CD4+ cell response to intracellular pathogens

Waldor



12º, 13º y 14º CICLO SEMINARIOS SEVERO OCHOA
“AVANCES EN BIOLOGÍA MOLECULAR” 2011/2012

12º, 13º y 14º SEVERO OCHOA CICLE
“ADVANCES IN MOLECULAR BIOLOGY” 2011/2012

	Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
12º CICLO	21 enero 2011	Marco Vignuzzi	Inst. Pasteur Paris, CNRS, France	New RNA virus fidelity variants to study the role of genetic diversity of RNA viruses in virus fitness and virulence
	18 marzo 2011	Juan Valcarcel	Centre de Regulació Genòmica, Barcelona	Mechanisms of alternative splicing regulation of cell proliferation and DNA damage response
	25 marzo 2011	Sarah Bray	Dept. of Physiology Development and Neuroscience Universidad de Cambridge, UK	Decoding the Notch signal
	29 abril 2011	Anne O'Garra	Head Division of Immunoregulation, MRC National Institute for Medical Research, The Ridgeway, London NW7 1AA, UK	The immune response in tuberculosis: from mouse models to human disease
	13 mayo 2011	Alec Jeffreys	Department of Genetics, University of Leicester, UK	Genetic fingerprinting and the turbulent genome
	03 junio 2011	John van der Oost	Wageningen University, Wageningen The Netherlands	The RNA-based CRISPR/Cas defence system of <i>E. coli</i>
	24 junio 2011	Rafael Yuste	Dept. of Biological Sciences, Columbia University, New York, USA	Dendritic Spines and Distributed Circuits
13º CICLO	18 noviembre 2011	Andrew Tobin	Dept. of Cell Physiology and Pharmacology University of Leicester, UK	Regulation of learning and memory - a role for the phosphorylation of G-protein coupled receptors
	17 febrero 2012	Dominique Mengin-Lecreulx	Laboratoire des Enveloppes Bactériennes et Antibiotiques IBBMC, CNRS University Paris, France	Elucidation of the metabolism of undecaprenyl-phosphate, a carrier lipid essential for bacterial cell-wall polymers synthesis
	02 marzo 2012	Matthew Freeman	MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK	Intercellular signalling: from flies to mammals, and back again
	13 abril 2012	Marcel Mechali	Institute of Human Genetics, CNRS Montpellier, France	DNA replication and its links with cell identity, reprogramming and genome stability
	27 abril 2011	Myriam Gorospe	National Institute on Aging, National Institutes of Health, Biomedical Research Center, Baltimore, MD, USA	Hu proteins: post-transcriptional paths to aging processes
	11 mayo 2012	Waldemar Vollmer	The Centre for Bacterial Cell Biology Baddiley Clark Building Medical School Newcastle University, UK	Regulation of bacterial cell wall growth and morphology
	01 junio 2012	Erin M. Schuman	Max Planck Institute for Brain Research, Frankfurt, Alemania	Local Transcriptomes and Proteomes at Neuronal Synapses
	22 junio 2012	Yvette van Kooyk	Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center Amsterdam, The Netherlands	Glycan modification of antigens, novel vaccination strategies for potentiating antigen specific immunity
	28 sept. 2012	Matthew N. Rasband	Department of Neuroscience, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA	Mechanisms of ion channel clustering in axons
14º CICLO	23 noviembre 2012	Thomas Lecuit	IBDML, CNRS-Aix Marseille University, Marseille, France	Biomechanical control of tissue morphogenesis

SEMINARIOS / SEMINARS



SEMINARIOS DE CENTRO 2011-2012

REGULAR SEMINARS 2011-2012

Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
17 enero 2011	Oscar Fernández Capetillo	CNIO, Madrid, España	Exploiting the DNA damage induced by oncogenes for killing cancer cells
03 febrero 2011	David Richardson	School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, UK	Electron Transport at the Microbe-Mineral Interface: resolving the molecular structure of protein nanowires
21 febrero 2011	Francesc Posas	Cell Signalling Research Group, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España	Control of adaptive responses to stress by SAPKs
07 marzo 2011	Nicolas Tapon	Apoptosis and Proliferation Control Laboratory Cancer Research, Londres, UK	Control of tissue size by the Hippo pathway in <i>Drosophila</i>
28 marzo 2011	Nick Brown	The Gurdon Institute and Department of Physiology, Development and Neuroscience University of Cambridge, UK	Linking cell adhesion and the cytoskeleton during morphogenesis
08 abril 2011	David. M. Gilbert	Department of Biological Science, Florida State University, Tallahassee, FL, USA	Developmental control of replication timing and chromosome architecture
11 abril 2011	Andreas Prokop	The University of Manchester Faculty of Life Sciences Manchester, UK	Spectraplakins - cytoskeletal integrators with key roles in brain development
06 mayo 2011	Zaal Kokaia	Director of Lund Stem Cell Center, University Hospital, Lund, Sweden	Stem cells and ischemic stroke: current status and future perspectives
11 mayo 2011	Ana M ^a Cuervo	Department of Development and Molecular Biology, Institute for Aging Studies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA	Selective Autophagy: Many doors into the lysosome
30 mayo 2011	Peter Agre	(Nobel Prize Chemistry 2003), Johns Hopkins Malaria Research Institute, Baltimore, MD, USA	Advocating for Human Rights and Science Diplomacy while Fighting Malaria Worldwide
10 junio 2011	Adi Mizrahi	Department of Neurobiology The Hebrew University of Jerusalem Jerusalem, Israel	New neurons in adult brains: Insight from live imaging
27 junio 2011	Alex P. Gould	IMRC National Institute for Medical Research, Londres, UK	Food for thought: nutrients, relative growth and brain sparing in <i>Drosophila</i>
11 julio 2011	Yasunori Hayashi	Brain Science Institute, RIKEN, Hirosawa, Wako, Saitama, Japan	Molecular mechanisms for structural plasticity of dendritic spines
13 julio 2011	Ed B. Ziff	New York University School of Medicine, NY, USA	Regulation of AMPA Receptor Trafficking by Natural Reward
03 octubre 2011	Niels Galjart	Erasmus Medical Center de Rotterdam The Netherlands	Microtubules and +TIPs and neuronal polarity
24 octubre 2011	Rob Martienssen	Cold Spring Harbor Laboratory, USA	Replication-coupled spreading of heterochromatin by RNA interference
24 octubre 2011	Dirk Schübeler	Friedrich Miescher Institute (FMI), Switzerland	Genetic determinants of epigenetic repression
12 diciembre 2011	Angel Carracedo	Fundación de Medicina Genómica, Universidad Santiago de Compostela CIBERER	La búsqueda del componente genético de la enfermedad
23 enero 2012	Gottfried Baier	Department for Medical Genetics, Molecular and Clinical Pharmacology, Innsbruck Medical University, Austria	PKC isotypes are druggable regulators of T cell effector functions <i>in vivo</i>
23 abril 2012	Frank Bradke	Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Ludwig-Erhard-Alleen, Bonn, Alemania	Cytoskeletal Mechanisms of Axonal Growth and Regeneration
07 mayo 2012	Markus Affolter	Biozentrum, University of Basel Switzerland	A deep look into the development of branched organs: from flies to fish

SEMINARIOS DE CENTRO 2011-2012

REGULAR SEMINARS 2011-2012

Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
21 mayo 2012	Jan Balzarini	Rega Institute for Medical Research Katholieke Universiteit Leuven Lovaina, Bélgica	Glycans on enveloped viruses: a novel tool for specific drug design
11 junio 2012	Gyorgy Szabadkai	Department of Cell and Developmental Biology Consortium for Mitochondrial Research University College London, UK	Mitochondrial biogenesis and cell death: roles in cancer and neurodegeneration
21 septiembre 2012	María Domínguez	Instituto de Neurociencias, CSIC-UMH Unidad de Neurobiología del Desarrollo Alicante España	Symmetry, proportion and accuracy in size control by <i>Drosophila</i> insulin-like peptide 8
24 septiembre 2012	Íñigo Lasa	Instituto de Agrobiotecnología UPNA-CSIC- Gobierno de Navarra, Pamplona, España	Transcripción solapante en bacterias: ¿Un nuevo mecanismo de regulación?
08 octubre 2012	Cayetano González	ICREA Research Professor IRB-Barcelona, España	Stem cell polarity and malignant tumor growth in <i>Drosophila</i>
22 octubre 2012	Jean Paul Vincent	National Institute for Medical Research, Medical Research Council The Ridgeway, London, UK	Murder and suicides in epithelial neighbourhood
25 octubre 2012	Javier Martínez-Picado	Instituto de Investigación en SIDA IrsiCaixa, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, España	Dulces virus: la pérdida del sistema inmunitario
26 octubre 2012	Xavier Estivill	Centro de Regulación Genómica de Barcelona, España	RNA toxicity in nucleotide-expansion neurodegenerative disorders
29 octubre 2012	Juan Burrone	King's College de Londres, UK	Homeostatic plasticity: from synapses to the axon initial segment.
19 noviembre 2012	Maria Carla Saleh	Viruses and RNAi Group Institut Pasteur Paris, France	RNAi and reverse transcription control RNA virus persistence in the insect model <i>Drosophila</i>
30 noviembre 2012	Alfonso Martínez-Arias	Department of Genetics, University of Cambridge, UK	Making cell fate decisions out of pluripotency: what Embryonic Stem cells tell us about the mammalian embryo

SEMINARIOS / SEMINARS



SEMINARIOS AD-HOC 2011-2012

AD-HOC SEMINARS 2011-2012

Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
20 enero 2011	José Luis Gómez-Skarmeta	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Sevilla, España	El ADN no codificante, su función en el desarrollo y en las enfermedades humanas
21 enero 2011	Juan Mata	Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK	Redes posttranscripcionales: una visión global
27 enero 2011	Marcelo López-Lastra	Centro de Investigaciones Médicas Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Chile	Translation initiation of the full-length mRNA of HIV-1. Functional and structural analysis of the 5' UTR
10 febrero 2011	Rosa Barrio	CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park Derio, España	Sumo in development and steroidogenesis
23 febrero 2011	Aurora Martínez	Department of Biomedicine, University of Bergen, Norway	Rescate y estabilización de proteínas mal plegadas mediante chaperonas farmacológicas
02 marzo 2011	Manuel Palacín	Instituto de Investigación Biomédica, Barcelona, España	Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. Transport and symmetry
28 marzo 2011	Mohit Kapoor	Department of Medicine, University of Montreal, Canada	Role of PPAGamma in skin health and arthritis: Focus on scleroderma and cartilage development
01 abril 2011	Rodrigo Fernández González	Developmental Biology Program, Sloan-Kettering Institute, NY, USA	Mechanisms of cell coordination in epithelial morphogenesis
28 abril 2011	Marcus Thelen	Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland	The Yin Yang of Chemokine Receptor Functions
20 mayo 2011	Sébastien Lyonnais	Unitat de Recerca de SIDA, Parc Científic de Barcelona, España	First steps in bottom-up self-assembly of HIV-1 molecular machine and its visualization by atomic force microscopy
31 mayo 2011	Alicia Castillo Holley	Fundadora del Grupo Wealthing (R), Ing. Agron., MBA, University of Western Australia	From Brain to Gain: transformando conocimiento en prosperidad
21 junio 2011	Christel H. Uittenbogaart	David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, USA	Interferon-alpha: protective or detrimental for human thymopoiesis
12 julio 2011	L. S. Shashidhara	Indian Institute of Science Education and Research (IISER), Pune, India	A novel context-specific component of Hedgehog pathway during wing development in <i>Drosophila</i>
06 septiembre 2011	Madhu Dikshit	Head of Pharmacology Division, Central Drug Research Institute, Lucknow, India	Biochemical and molecular characteristics of NOS isoforms expressed in human neutrophils and their functional importance
12 septiembre 2011	Sue Goo Rhee	Division of Life and Pharmaceutical Sciences, Ewha Womans University, Seoul, Korea	Intracellular Messenger Function of Hydrogen Peroxide and Regulation of Peroxiredoxin
19 septiembre 2011	Sanjay W. Pimplikar	Department of Neurosciences, Lerner Research Institute, Cleveland, Ohio, USA	AD-360: Amyloid-independent mechanisms of Alzheimer's disease
19 octubre 2011	Mary C. McKenna	Department of Pediatrics, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA	Glutamatergic neurotransmission-- key roles of compartmentation and energy metabolism
24 octubre 2011	Gert Matthijs	Laboratory for Molecular Diagnosis, Center for Human Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica	Congenital Disorders of Glycosylation: a rapidly expanding group of inborn errors of metabolism
25 octubre 2011	Elena R. Álvarez-Buylla	Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)	From genotypes to phenotypes and evolution via epigenetic landscapes: towards a general theory of morphogenesis using flower development as study system

SEMINARIOS AD-HOC 2011-2012

AD-HOC SEMINARS 2011-2012

Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
31 octubre 2011	Thomas Michel	Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, USA	Nitric oxide synthesis and cardiovascular signaling
08 noviembre 2011	Gonzalo Peluffo	Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay	Tobacco smoke mediated nitroxidative stress to the endothelium: insights on peroxynitrite detection in endothelial cells
24 noviembre 2011	Joaquín de Navascués	Department of Genetics, University of Cambridge, UK	Stochastic stem cell decisions in the <i>Drosophila</i> adult intestine
20 diciembre 2011	Bruno Conti	The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA	Neuroimmunology of interleukins 18 and 13
19 diciembre 2011	Elena Maganto-García	Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, USA	Hypercholesterolemia-induced regulatory T cell responses in atherosclerosis
16 enero 2012	Buzz Baum	Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London, UK	Epithelial refinement: generating order from disorder
19 enero 2012	Hernán López-Schier	Centro de Regulación Genómica, Barcelona	Planar cell inversions occur through homotypic adhesion and heterotypic junction remodeling
26 enero 2012	Elena Caro Bernat	Department of MCD Biology, University of California Los Angeles, USA	Locus-specific and DNA-methylation-independent heterochromatin formation in <i>Arabidopsis thaliana</i>
03 febrero 2012	Eleonora Lapi	Vascular Biology Laboratory, Cancer Research, London, UK	Revealing the pieces of the vascular puzzle
22 febrero 2012	David Gómez Miguel	Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid	Systems Biology Approaches to Cancer and Development
08 marzo 2012	Jorge A. Iñiguez-Lluhi	Associate Professor of Pharmacology, University of Michigan, USA	Diseases of SUMOylation: Lessons from transcription factors and ion channels
14 marzo 2012	Ann Hill	Department of Molecular Microbiology and Immunology, Oregon Health and Sciences University, Portland, Oregon, USA	Cytomegalovirus and the immune system: for better or for worse
15 marzo 2012	Pura Muñoz	ICREA y Universidad Pompeu Fabra	Inflammation-mediated skeletal muscle regeneration and fibrosis
16 marzo 2012	Ignacio Melero	CIMA, CUN and Medical School, University of Navarra, Pamplona	Multilayered mechanisms of action in CD137-based cancer immunotherapy
29 marzo 2012	Terry Lechler	Assistant Professor of Cell Biology and Dermatology, Duke University School of Medicine, Durham, NC	Cytoskeletal Control of Epidermal Function
30 marzo 2012	Luis Alberto Baena-López	Developmental Neurobiology, National Institute for Medical Research, London, UK	New tools for <i>Drosophila</i> , new frontiers to explore
11 abril 2012	Bernhard Brüne	Faculty of Medicine, Goethe University, Frankfurt, Germany	Sphingosine-1-phosphate from apoptotic cells reprograms macrophages
19 abril 2012	Daved Fremont	Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine, St- Louis, USA	Structural mechanisms of viral immune evasion
26 abril 2012	Antonio Herrera-Merchán	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid	Shedding light on stem cell aging: consequences of Ezr2 gain-of-function <i>in vivo</i>
07 mayo 2012	Erich Gnaiger	Medical University of Innsbruck, Department of Visceral, Transplant and Thoracic Surgery, Austria	Combined oxygen-fluorescence method for the simultaneous measurement of H ₂ O ₂ production and respiration in cells

SEMINARIOS / SEMINARS

SEMINARIOS AD-HOC 2011-2012

AD-HOC SEMINARS 2011-2012

Fecha / Date	Seminarista / Speaker	Centro / Center	Título del seminario / Title of seminar
08 mayo 2012	José Luis Martín Ventura	Instituto de Investigación Sanitaria, Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid	Vascular proteomics, a translational tool to understand atherothrombosis
10 mayo 2012	Héctor Herranz	Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore	El miRNA bantam y la vía del EGFR cooperan en la formación de tumores
17 mayo 2012	Marcus Bischoff	Department of Zoology, University of Cambridge, UK	Cell behaviours during the morphogenesis of the adult abdominal epidermis of <i>Drosophila</i>
18 mayo 2012	Rodrigo Bermejo	Instituto de Biología Funcional y Genómica, Salamanca	Topological determinants of genome integrity
21 mayo 2012	Sam Kunes	Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA	How a novel proteolytic cleavage event controls Hedgehog's export and development patterning activity
25 mayo 2012	Keiko Sugimoto	RIKEN Plant Science Center, Tsurumi, Yokohama, Japan	Transcriptional control of cell differentiation and dedifferentiation in plants
08 junio 2012	Miguel García Díaz	Department of Pharmacological Sciences, Stony Brook University, NY, USA	MTERF proteins and the regulation of mitochondrial gene expression
14 junio 2012	Carlos Fernández-Hernando	New York University School of Medicine, NY, USA	MicroRNA functions in vascular and metabolic disease
15 junio 2012	Ana Terriente	Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, UK	Direct targets of Notch in <i>Drosophila</i> blood cell development reveal co-operation with Lozenge/runx to canalize a specific cell fate programme
28 junio 2012	Leticia López González	Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA)	Chromatin mediates the repression of master genes of flowering initiation in <i>Arabidopsis</i>
06 julio 2012	Carlos Vallin	Laboratorio de Biotecnología, CEIEB, IFAL, UH, Cuba	<i>Streptomyces lividans</i> potencialidades como hospedero para la producción de antígenos recombinantes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> biológicamente activos para fines diagnóstico y vacunales de la tuberculosis
09 julio 2012	José A. Villadangas	Department of Microbiology and Immunology, and Department of Biochemistry and Molecular Biology (Bio21 Institute), University of Melbourne, Australia	Presentación antigénica por células dendríticas: quién, cómo y cuándo
19 septiembre 2012	Javier Terriente	Developmental Biology Group, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra	The hindbrain boundary: A signalling pathways crossroad
26 septiembre 2012	Erkin Kuru	University of Indiana, USA	In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria by fluorescent D-amino acids
16 octubre 2012	Elena Papaleo	Department of Biology, Biomolecular Sciences, University of Copenhagen, Denmark	Mechanisms of intra- and inter-molecular communication in proteins: a molecular dynamics investigation
30 octubre 2012	Juan M. Alfaro	Neuron Biosciences (Granada)	Zebrafish: el nuevo ratón de laboratorio?
05 noviembre 2012	Enrique Martín Blanco	Instituto de Biología Molecular de Barcelona	Morphogenesis mechanisms
07 noviembre 2012	Makoto Kawamukai	Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Matsue, Japan	Regulation of sexual differentiation in fission yeast
12 noviembre 2012	Alfredo Aguilar Romanillos	Head of Unit Biotechnologies, European Commission, DG Research and Innovation, Brussels, Belgium	Horizon 2020, the new EU Research Framework Programme
19 noviembre 2012	Michael Levine	Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, USA	Mechanisms of Transcriptional Precision in the <i>Drosophila</i> embryo
26 noviembre 2012	Santiago Rodríguez de Córdoba	Dept. Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid	Pathogenic mechanisms in Lafora Disease
14 diciembre 2012	Josana Rodríguez	The Wellcome Trust Gurdon Institute, University of Cambridge, UK	Identification of Cell Polarity Regulators by Systematic Genetic Interaction Screening





ESCUELA TALLER

FUNDACIÓN SEVERO OCHOA

F.S.O. Training School

La Escuela Taller “Severo Ochoa” se configura como un programa mixto de empleo y formación subvencionado por la Comunidad de Madrid y el Fondo Social Europeo, que tiene como objetivo mejorar la ocupabilidad de jóvenes desempleados menores de 25 años con la finalidad de facilitar su inserción laboral.

La E.T. tiene como propósito la obtención de una capacitación y cualificación profesional en la especialidad formativa de Analista de Ensayos Microbiológicos y Biotecnológicos. Dentro de los diferentes perfiles incluidos en la figura del Técnico de Laboratorio, la formación en alternancia con la práctica profesional que durante 24 meses reciben nuestros alumnos, está orientada hacia los laboratorios de investigación científica.

La E.T. se divide en 4 fases de 6 meses, siendo la primera exclusivamente formativa donde los alumnos tienen derecho a percibir una beca de asistencia. En La segunda etapa del proyecto (18 últimos meses), los Alumnos/Trabajadores complementarán su formación en alternancia con el trabajo, realizando prácticas profesionales en proyectos de investigación que se estén llevando a cabo en el CBMSO, teniendo un contrato para la formación suscrito con la entidad promotora del proyecto.





PROMOCIÓN 2012

DIRECTORA

Isabel del la Rosa Santos

PROFESORAS

Cristina Cacheiro Llaguno

Nuria Sánchez López

ALUMNOS

Sven Calduch Ramírez

Paloma Domínguez Sánchez

Ana María Flores Robles

Kevin Sandro León Marquina

Miguel Prieto García

Ana Renshaw Calderón

Juan Pablo Sánchez Huaman

Víctor Serrano García-Cortazar

Lorena Vázquez Rioja

Verónica Flores Usca

Miriam Lucas Santamaría

Noelia Aguado Abajo

Alex Patricio Agreda Saltos

Diego Sánchez Carillo

José Luis Jiménez Muñoz

Irene Tejada Sánchez



Diploma VI Edición Escuela Taller

MEMORIA CIENTÍFICA CBMSO 2011-2012
Scientific Report 2011-2012

Coordinadores / Coordinators

José Berenguer Carlos y César de Haro Castella

Diseño, maquetación y fotografías / *Graphic design and fotografapies*

Servicios de Diseño Gráfico y Fotografía del CBMSO /
Graphic Design and Photography Services of CBMSO

(José I. Belio López y José A. Pérez Gracia)

Colaboraciones / *Collaborations*

Preparación de textos
(Gloria Escribano Sánchez)

Impresión / *Printed by*

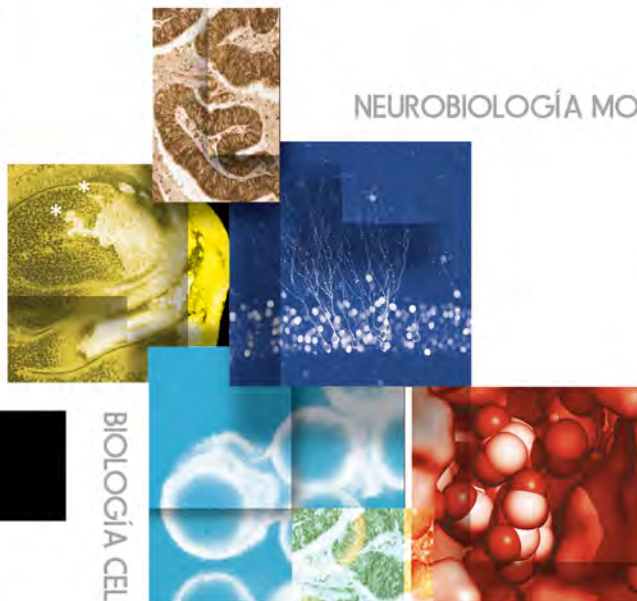
Gramadosa, S.L.

Depósito Legal: M-19697-2013

DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN

DINÁMICA Y FUNCIÓN DEL GENOMA

NEUROBIOLOGÍA MOLECULAR



BIOLOGÍA CELULAR
E INMUNOLOGÍA

VIROLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA

CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA

C/ Nicolás Cabrera, 1
Campus de la Universidad Autónoma de Madrid
28049 Madrid

Tel.: (+34) 91 196 4401

Fax: (+34) 91 196 4420

www.cbm.uam.es

