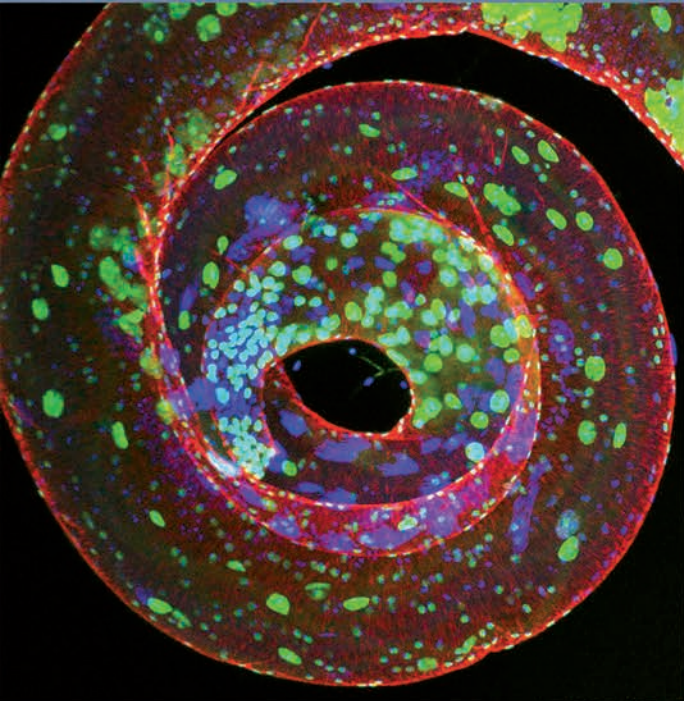
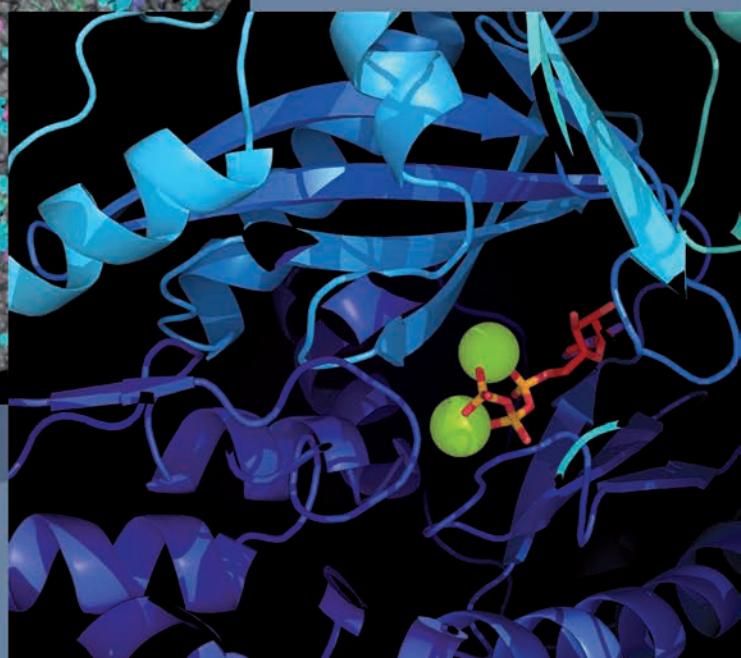
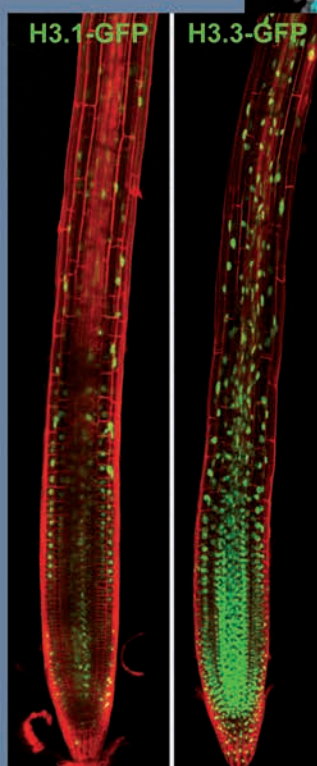
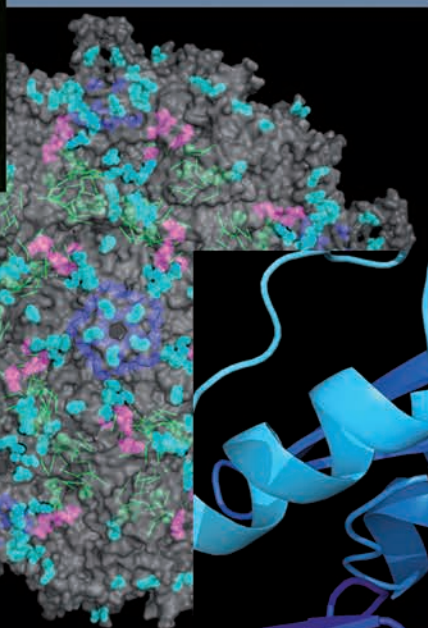




MEMORIA CIENTÍFICA



SCIENTIFIC REPORT
2013-2014

CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA

CBM_{SO}



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*
- 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 Tráfico de membranas
Membrane trafficking
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 Fisiopatología mitocondrial
Mitochondrial pathophysiology
SUSANA CADENAS ÁLVAREZ
- 26 Plasticidad Celular en Desarrollo y Cáncer
Cellular Plasticity in Development and Cancer
CÉSAR COBALEDA HERNÁNDEZ
- 28 Interacción entre el citoesqueleto y la membrana plasmática
Cytoskeleton-plasma membrane interactions
ISABEL CORREAS HORNERO
- 30 Biogénesis y función de la mitocondria y su repercusión en patología
Biogenesis and function of mitochondria and its role in pathology
JOSÉ M. CUEZVA
- 32 Inmunología Viral
Viral Immunology
MARGARITA DEL VAL LATORRE
- 34 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
JOSÉ FERNÁNDEZ-PIQUERAS
- 36 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
- 38 Acciones de los prostanoïdes en procesos inflamatorios
Prostanoids Actions in Inflammatory Processes
MIGUEL ÁNGEL ÍÑIGUEZ PEÑA
- 40 Bases moleculares y celulares de la fisiopatología asociada a la expresión de antígenos intracelulares
Molecular and cellular basis of the physio(patho)logy associated with the expression of intracellular antigens
JOSÉ MARÍA IZQUIERDO JUÁREZ
- 42 Fisiopatología Molecular de la Fibrosis
Molecular Pathophysiology of Fibrosis
SANTIAGO LAMAS PELÁEZ
- 44 Grupo de Fisiopatología Molecular de la Inflamación y Fibrosis Peritoneal (PERINFIB)
Group for the Study of Peritoneal Inflammation and Fibrosis Molecular Pathophysiology
MANUEL LÓPEZ CABRERA
- 46 Inmunología de los antígenos de la histocompatibilidad
Immunology of human histocompatibility antigens
JOSÉ A. LÓPEZ DE CASTRO ÁLVAREZ
- 48 Mecanismos de señalización y regulación de receptores acoplados a proteínas G
G protein-coupled receptor networks: signal transduction and pathophysiological implications
FEDERICO MAYOR
- 50 Biología celular de la inflamación
Cell biology of inflammation
JAIME MILLÁN MARTÍNEZ
- 52 Papel del remodelado de la matriz extracelular en el sistema cardiovascular
Extracellular matrix remodeling in the cardiovascular system
FERNANDO RORÍQUEZ PASCUAL
- 54 Homeostasis metabólica
Metabolic homeostasis
IGNACIO VICENTE-SANDOVAL
- 56 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 PEIRO
- 58 Desarrollo del sistema linfohematopoyético humano
Development of the human lymphohematopoietic system
MARÍA L. TORIBIO GARCÍA

- 62 Modulación de la respuesta inmune por virus
Viral modulation of the immune response
ANTONIO ALCAMI PERTEJO
- 64 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
- 66 Ecología Molecular de Ambientes Extremos
Molecular Ecology of Extreme Environments
RICARDO AMILS PIBERNAT
- 68 División celular bacteriana y resistencia a antibióticos
Bacterial cell division and antibiotics resistance
JUAN ALFONSO AYALA SERRANO
- 70 Biotecnología y genética de bacterias termófilas extremas
Biotechnology and genetics of extreme thermophilic bacteria
JOSÉ BERENGUER CARLOS
- 72 Variabilidad genética de virus RNA
Genetic variability of RNA viruses
ESTEBAN DOMINGO SOLANS
- 74 Bioingeniería de enzimas de levaduras para generar compuestos bioactivos
Yeast enzymes bioengineering to generate bioactive compounds
MARÍA FERNÁNDEZ LOBATO
- 76 Ingeniería de Virus y Nanobiotecnología
Virus Engineering and Nanobiotechnology
MAURICIO GARCÍA MATEU
- 78 Grupo de Modelado Molecular
Molecular Modelling Group
PAULINO GÓMEZ-PUERTAS
- 80 Desarrollo de herramientas genéticas para la manipulación de bacterias Gram+ a partir de la caracterización molecular de un plásmido de *Bacillus*
Developing genetic tools to modify clinically and industrially relevant Gram+ bacteria by exploring transfer and other functions of a Bacillus plasmid
WILFRIED J. J. MEIJER
- 82 Retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana y terapia antirretroviral
Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and antiretroviral therapy
LUIS MENÉNDEZ ARIAS
- 84 Mecanismos moleculares de interacción virus-célula: el modelo del virus de la peste porcina africana
Virus Cell Interaction. The ASFV Model
YOLANDA REVILLA NOVELLA
- 86 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
- 88 Estructura del mRNA y control traduccional en sistemas biológicos
mRNA structure and translational control in biological systems
IVÁN VENTOSO

- 92 Función de las rutas de señalización Inter celulares en el control de la proliferación celular y la regeneración
Function of signalling pathways in the control of cell proliferation and organ regeneration
ANTONIO BAONZA CUENCA
- 94 Morfogénesis y Diferenciación del Sistema Nervioso de Vertebrados
Morphogenesis and Differentiation of the Vertebrate CNS
PAOLA BOVOLENTA NICOLAO
- 96 Regulación epigenética de la expresión génica durante el desarrollo de *Drosophila*
Epigenetic regulation of gene expression during Drosophila development
ANA MARÍA DE BUSTURIA JIMENO
- 98 Base molecular y celular de la organogénesis en *Drosophila*
Molecular and cellular basis of Drosophila organogenesis
SONSOLES CAMPUZANO CORRALES
- 100 Análisis de la señalización celular durante el desarrollo de epitelios en *Drosophila melanogaster*
Analysis of signalling pathways directing epithelial development in Drosophila
JOSÉ F. DE CELIS
- 102 Mecanismos de señalización en el desarrollo
Signaling mechanisms in development
ISABEL GUERRERO VEGA
- 104 Especificación de destinos celulares en el desarrollo del sistema nervioso central
Cell fate specification in the development of the central nervous system
FERNANDO JIMÉNEZ DÍAZ-BENJUMEA
- 106 Laboratorio de polaridad epitelial
Epithelial polarity laboratory
FERNANDO MARTÍN BELMONTE
- 108 Control genético de la morfogénesis en *Drosophila*
Genetic control of morphogenesis in Drosophila
GINÉS MORATA PÉREZ
- 110 Genética del desarrollo de derivados mesodérmicos en *Drosophila*: sistemas muscular y de filtración
Developmental biology of mesoderm derivatives: muscular and filtration systems
MAR RUIZ GÓMEZ
- 112 Especificación segmental y formación de patrón en *Drosophila*
Segmental specification and pattern formation in Drosophila
ERNESTO SÁNCHEZ-HERRERO ARBIDE

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 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
MARÍA JESÚS BULLIDO
- 122 Fisiopatología y Terapia de las enfermedades neurodegenerativas: Ataxia de Friedreich
Physiopathology and therapy of Neurodegenerative diseases: Friedreich's Ataxia
JAVIER DÍAZ-NIDO
- 124 Bases Moleculares de la Plasticidad Neuronal
Molecular Bases of Neuronal Plasticity
FCO. JAVIER DÍEZ GUERRA
- 126 Plasticidad y sobrevivencia cerebral durante el envejecimiento
Survival and plasticity in the aging brain
CARLOS DOTTI
- 128 Mecanismos moleculares y celulares de la plasticidad sináptica
Molecular and cellular mechanisms for synaptic plasticity
JOSÉ ANTONIO ESTEBAN GARCÍA
- 130 Bases moleculares de las sinápsis glutamatérgicas
Molecular bases of glutamatergic synapses
CECILIO GIMÉNEZ MARTÍN / FRANCISCO ZAFRA
- 132 Lípidos en la fisiología y patología neuronal
Lipids in neuronal physiology and pathology
MARÍA DOLORES LEDESMA MUÑOZ
- 134 Enfermedad de Huntington y otras enfermedades del sistema nervioso central
Huntington's disease and other CNS disorders
JOSÉ JAVIER LUCAS LOZANO
- 136 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
- 138 Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias e investigación en nuevas terapias
Molecular basis of inherited metabolic diseases and research in novel therapies
LOURDES RUIZ DESVIAT
- 140 Señalización mitocondrial del calcio y señalización de insulina/leptina en envejecimiento
Calcium signalling in mitochondria and insulin/leptin signalling during ageing
JORGINA SATRÚSTEGUI GIL-DELGADO
- 142 Mecanismos moleculares de neurodegeneración
Molecular mechanism of neurodegeneration
FRANCISCO WANDOSELL JURADO

UNIDAD DE BIOINFORMÁTICA

BIOINFORMATICS UNIT

- 168 UGO BASTOLLA BUFALINI

DEPARTAMENTO DE CULTURA CIENTÍFICA

SCIENCE AND SOCIETY DEPARTMENT

- 172 JOSÉ ANTONIO LÓPEZ GUERRERO

SERVICIOS CIENTÍFICOS

SCIENTIFIC FACILITIES

- 176 Animalario
Animal Facility
JAVIER PALACÍN URQUIJO
ELENA HEVIA HERNÁNDEZ
- 177 Servicio de Bioinformática
Bioinformatics Facility
DAVID ABIA HOLGADO
- 178 Servicio de Citometría de Flujo
Flow Cytometry Facility
BERTA RAPOSO PONCE
- 179 Servicio de Fermentación
Fermentation Facility
DIONISIO UREÑA RODRÍGUEZ
- 180 Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva
Genomics and Next-Generation Sequencing Facility
FERNANDO CARRASCO RAMIRO
- 181 Servicio de Microscopía Electrónica (SME)
Electron Microscopy Facility (EMF)
MARÍA TERESA REJAS MARCO
- 182 Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)
Optical and Confocal Microscopy Facility (SMOC)
CARLOS SÁNCHEZ MARTÍN
- 183 Servicio de Química de Proteínas y Proteómica
Proteomics and Protein Chemistry Core Facility
ANA ISABEL MARINA RAMÍREZ
- 184 Servicio de Transgénesis
Transgenesis Facility
M^a BELÉN PINTADO SANJUANBENITO

DINÁMICA Y FUNCIÓN DEL GENOMA GENOME DYNAMICS AND FUNCTION

- 146 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
- 148 Bases moleculares de la citopatología viral y fúngica
Molecular bases of viral and fungal citopathology
LUIS CARRASCO LLAMAS
- 150 Regulación post-transcripcional de la expresión génica en eucariotas
Post-transcriptional regulation of gene expression in eukaryotes
CÉSAR DE HARO CASTELLA
- 152 Organización funcional del genoma de mamíferos
Functional organization of the mammalian genome
MARÍA GÓMEZ VICENTEFRANQUEIRA
- 154 División celular, replicación del genoma y cromatina
Cell division, genome replication and chromatin
CRISANTO GUTIÉRREZ
- 156 Iniciación interna de la traducción en mRNAs eucarióticos
Internal initiation of translation in eukaryotic mRNAs
ENCARNACIÓN MARTÍNEZ-SALAS
- 158 Regulación de la expresión génica en *Leishmania*
Regulation of gene expression in Leishmania
JOSÉ MARÍA REQUENA ROLANÍA
- 160 Replicación del DNA del bacteriófago ϕ 29. Virus de la peste porcina Africana
Replication of bacteriophage ϕ 29 DNA. African swine fever virus
MARGARITA SALAS FALGUERAS
- 162 Replicación cromosómica y estabilidad del genoma
Chromosome replication and genome stability
JOSÉ ANTONIO TERCERO ORDUÑA
- 164 Grupo Reparación del DNA bacteriano
Repair of bacterial DNA group
MIGUEL DE VEGA JOSÉ

SERVICIOS GENERALES

GENERAL SERVICES

- 188

SEMINARIOS

SEMINARS

- 192 Lecciones conmemorativas / Memorial Lectures
- 193 Seminarios Severo Ochoa / Severo Ochoa Seminars
- 194 Seminarios AD-HOC / AD-HOC Seminars
Seminarios del Centro / CBM Seminars
- 195 Seminarios Special / Special Seminars



Reflexiones del Director / Director's Remarks



José F. de Celis

DIRECTOR DEL CBMSO / CBMSO DIRECTOR

En primer lugar quisiera agradecer al personal que forma parte del Claustro Científico del CBMSO el voto de confianza que depositó en mí en mayo del año 2014, y que supuso la propuesta de mi nombramiento a nuestras autoridades del CSIC y la UAM para el cargo de Director del CBMSO. También a Santiago Lamas, Director del Centro durante los años 2012-14, que me facilitó enormemente la tarea de asumir esta dirección. En el escaso periodo de tiempo en que he tenido el privilegio de ejercer como director, he podido conocer y apreciar mejor el inmenso trabajo, la dedicación y la profesionalidad del personal que permite el funcionamiento diario de este centro, tanto en sus aspectos administrativos como científicos.

Durante el periodo de tiempo que cubre esta memoria, los años 2013-14, hemos podido mantener los parámetros de productividad científica y formativa que han caracterizado a nuestro centro en los últimos años.

Este hecho se refleja con claridad en los documentos que recogen la actividad de los 70 grupos que en la actualidad componen los cinco departamentos científicos, y en sí mismo debe ser un motivo de satisfacción para todos nosotros, al haberse realizado en un entorno económico muy complicado y de escasez presupuestaria. Las más de 35 tesis y 253 publicaciones de media anuales atestiguan que, a pesar de las dificultades, nuestro centro sigue siendo científicamente productivo, y que hemos sido capaces de hacer más con menos gracias al esfuerzo individual y colectivo de los miembros del CBMSO.

A ninguno de vosotros se os escapa que el entorno nacional e internacional en el que se desenvuelve nuestra labor profesional es cada vez más competitivo, lo que implica que mantenernos como centro de referencia en investigación en

I would like to thank the CBMSO scientific faculty for endorsing my proposal as CBMSO director to our authorities in the CSIC and UAM. I also would like to thank Santiago Lamas, our director during the 2012-14 period, for facilitating me the transition to this role. In the brief period of time in which I have had the privilege of acting as CBMSO director, I have come to know and appreciate the effort, dedication and professionalism of our personnel. These qualities are really what allow the daily functioning of our Center, both in its administrative and scientific sides.

During the period of time included in this Scientific report, the years 2013-14, we have been able to maintain the scientific and formative parameters that had characterised our activity in the last years. This fact is clearly apparent in the documents included in the report that gather the activity of the 70 research lines included in our five scientific departments, and by itself should be a reason for our satisfaction, as this period has been economically complex and with considerable budget restraints. The more that 35 average defended PhD and 250 scientific publications per year confirm that, despite the difficulties, the CBMSO remains scientifically productive, and that we have been able to do more with less than to the individual and collective effort of the CBMSO personnel.

I believe we all understand that the national and international environment in which we develop our professional work is increasingly becoming more competitive, and this implies that remaining a reference Center in the area of Molecular Biology requires a permanent updating effort, a better definition of our strategies, a much more optimized system of resource allocations and perhaps also a vision of where we want to be in the next future. Our current strategic plan defines the global objective of the CBMSO as "to gather together the most active groups in the areas of Biochemistry, Biomedicine and Molecular Biology working in Spain". The CBMSO was funded under this assumption, and I believe that maintaining multidis-

el área de la Biología Molecular requiere un esfuerzo permanente de actualización, una mejor definición de nuestras estrategias de futuro, un uso optimizado de los recursos de los que disponemos y quizá también un objetivo común que defina nuestra trayectoria como centro para los próximos años. Nuestro vigente plan estratégico define el objetivo global del CBMSO como "reunir a los grupos mas activos en las áreas de la Bioquímica, Biomedicina y Biología Molecular que trabajan en España". Con este principio fue fundado el CBM, y creo que mantener la multidisciplinaridad y el apoyo a líneas de investigación que son punteras en Biología Molecular debe ser una prioridad en el desarrollo futuro del centro. También deberíamos ser capaces de definirnos de una manera más precisa, para que, aprovechando el potencial de nuestros grupos de investigación, desarrollemos una identidad como Centro más acorde con la realidad de la ciencia actual. En este sentido presentamos a la última convocatoria Severo Ochoa de centros de excelencia, que desafortunadamente fue desestimada, una línea estratégica de investigación enfocada en el estudio de las bases moleculares de patologías asociadas con la edad. Este planteamiento lo consideramos como un posible punto de encuentro que reúna y potencie a las diferentes líneas de experimentación que actualmente desarrollamos, incluyendo los estudios sobre enfermedades neurodegenerativas, sobre los componentes inmunes, inflamatorios y metabólicos de diversas patologías y sobre las alteraciones en el control de la proliferación y diferenciación celular, sin olvidar la investigación en distintos organismos modelo que nos sirvan para entender desde una ciencia más fundamental las bases moleculares de estos procesos. Quizá una mejor y más precisa definición de nuestros objetivos estratégicos ayude a determinar una trayectoria de futuro que saque el mejor partido de nuestro centro.

La próxima firma del convenio entre la UAM y el CSIC nos deberá permitir una aún mejor integración del potencial que cada institución aporta al centro, así como elaborar un reglamento interno que agilice la gestión diaria de éste. Sin embargo, no debemos olvidar que la responsabilidad final de impulsar este centro hacia el futuro es fundamentalmente nuestra, y esto nos incluye a todo el personal que formamos parte de él. En este sentido, considero que es imprescindible dinamizar y mejorar los procesos de asignación de recursos, así como promover la incorporación y el desarrollo de jóvenes investigadores. En mi opinión, el centro está ahora en una etapa de transición que tenemos que ser capaces de aprovechar y resolver para garantizar nuestra posición futura como centro de referencia. Esto implica gestionar de manera más efectiva la enriquecedora heterogeneidad de este centro, para combinar el progreso de nuestros investigadores con la posibilidad de incorporar otros grupos de investigación punteros. Para ello estamos trabajando, y confío en que la generosidad y profesionalidad de nuestro personal hará posible generar una dinámica de funcionamiento más acorde con las necesidades actuales.

Quiero de nuevo expresar mi agradecimiento a todos los excelentes profesionales que componen la plantilla de este centro, así como a todos los implicados en las distintas comisiones, a la vicedirectora y a los directores de departamento que con su esfuerzo generoso, implicación y buen hacer permiten el funcionamiento de este centro. También quiero mencionar, animar y poner en valor el trabajo que realizan nuestros técnicos, estudiantes, doctorandos y postdoctorales. A ellos pertenece el futuro, y a nosotros proveerles de las mejores condiciones de trabajo y desarrollo profesional. Para finalizar, quiero recordar desde el cariño y el respeto a nuestros colegas Manuel Barajas Marín, José M^a Galán González, Jesús Pozuelo Torrijos y Alfredo Villasante Atienza.

ciplinarly and supporting top Molecular Biology research lines must be a priority in the future development of the Center. We should also be capable of defining ourselves in a more precise manner, to develop an identity as a research institute that building from the strengths of our research lines were more adjusted to the current National and International scenarios. In this line, and after considerable discussions, we proposed to the last Severo Ochoa Center of excellence call, which unfortunately was dismissed, the area "research in pathologies associated to aging". We considered that this definition was a possible meeting point to gather and potentiate most of experimentation that we actually develop, including the work on neurodegenerative diseases, the immune, inflammatory and metabolic components of a variety of pathologies and the alterations in the control of cellular proliferation and differentiation. Perhaps a better and more precise definition of our scientific objectives would help to determine a future trajectory that capitalises in the strengths of our scientific and technical personnel.

The future but imminent signature of the agreement between the UAM and CSIC should allow us a better integration of the potential that each institution contributes to our Center, and also to elaborate a set of rules to improve its daily management. Although this is a very important aspect for future developments, I would like to emphasize that the responsibility to impulse forward this Centre mostly reside in our hands. In this sense, it is ineludibly to improve the current dynamics in the processes of resource allocation to the research lines, as well as to promote the incorporation and development of young investigators. In my view, the CBMSO is now in a transitional period that we should be able to navigate efficiently to guarantee our future position as a reference research Institute without becoming irrelevant. We have to be able to manage the heterogeneity of this Centre, to combine the development of our investigators with the incorporation of other relevant research groups. We are working to achieve this, and I believe the generosity and professionalism of our personnel should make possible to generate a functioning dynamics more in line with the current demands.

I will like to express again my appreciation to all the excellent professionals that form part of this Institute, as well as my gratitude to all of you involved in the different committees, the vice director and the department directors, who with their generous effort and commitment allow our daily functioning. I would also like to acknowledge and encourage the work carried out by our technical personnel, students, PhDs and postdocs. The future belongs to them, and our responsibility is to provide them with the best possible working conditions and professional development opportunities. To finish, I would like to remember our colleagues that passed away in recent dates, Manuel Barajas Marín, José M^a Galán González, Jesús Pozuelo Torrijos y Alfredo Villasante Atienza

Organizational Structure



José F. de Celis
CBMSO DIRECTOR



Cristina Murga Montesinos
CBMSO VICE-DIRECTORA



Germán Lerma Rodrigo
CBMSO GERENTE

INSTITUTE DIRECTORS



Cecilio Giménez Martín
DIRECTOR OF THE INSTITUTO
UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR (UAM)



César de Haro Castella
DIRECTOR OF THE INSTITUTO
DE BIOLOGÍA MOLECULAR
“ELADIO VIÑUELA” (CSIC)

DEPARTMENT DIRECTORS



María L. Toribio García
DEPARTMENT OF
CELL BIOLOGY AND
IMMUNOLOGY



Ricardo Amils Pibernat
DEPARTMENT OF
VIROLOGY AND
MICROBIOLOGY



Paola Bovolenta Nicolao
DEPARTMENT OF
DEVELOPMENT AND
DIFFERENTIATION



Alberto Martínez Serrano
DEPARTMENT OF
MOLECULAR
NEUROBIOLOGY



Crisanto Gutiérrez Armenta
DEPARTMENT OF
GENOME DYNAMICS
AND FUNCTION

Prof. Hans-Georg Kraeusslich, Chair

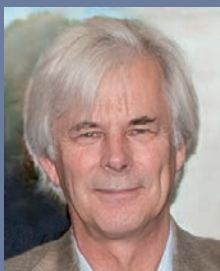
Department of Infectious Diseases, Virology
University Hospital Heidelberg
Heidelberg, Germany

**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



Scientific Advisory Board (SAB)

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

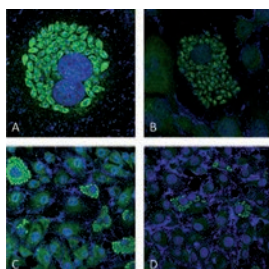
**Dr. Matthew Freeman**

Sir William Dunn School of Pathology
University of Oxford
Oxford, United Kingdom

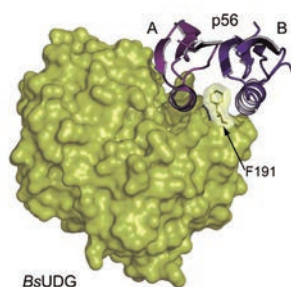
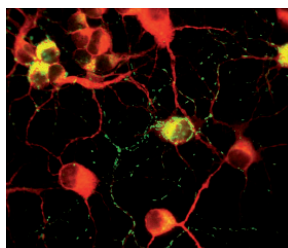
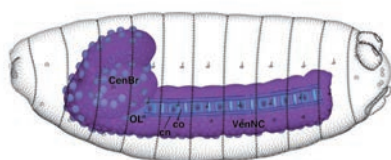
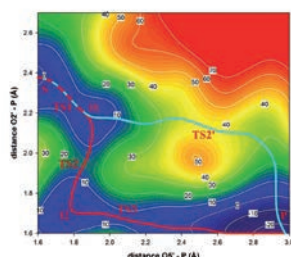
**Dr. Reinhard Faessler**

Department of Molecular Medicine
Max Planck Institute of Biochemistry
Martinsried, Germany





A new Quantum Mechanics / Molecular Mechanics (QM/MM) approach: FIREBALL / AMBER



22
Groups

CELL BIOLOGY AND IMMUNOLOGY

14
Groups

VIROLOGY AND MICROBIOLOGY

11
Groups

DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION

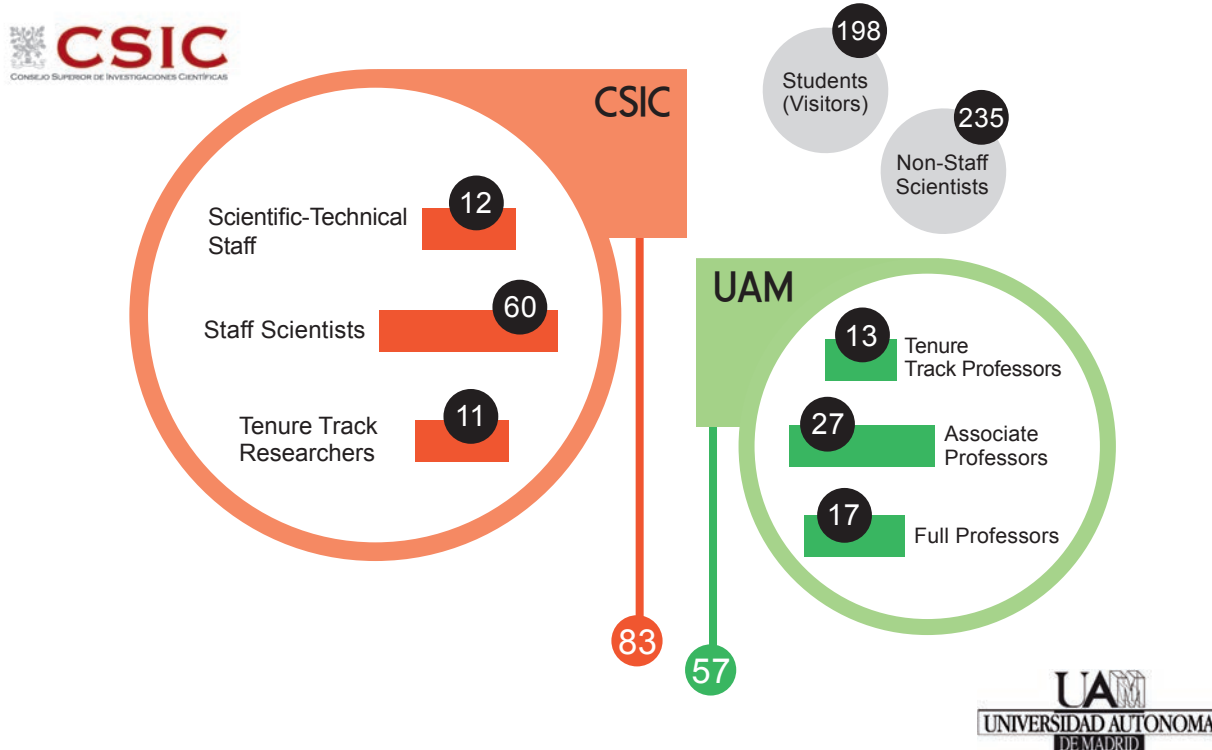
14
Groups

MOLECULAR NEUROBIOLOGY

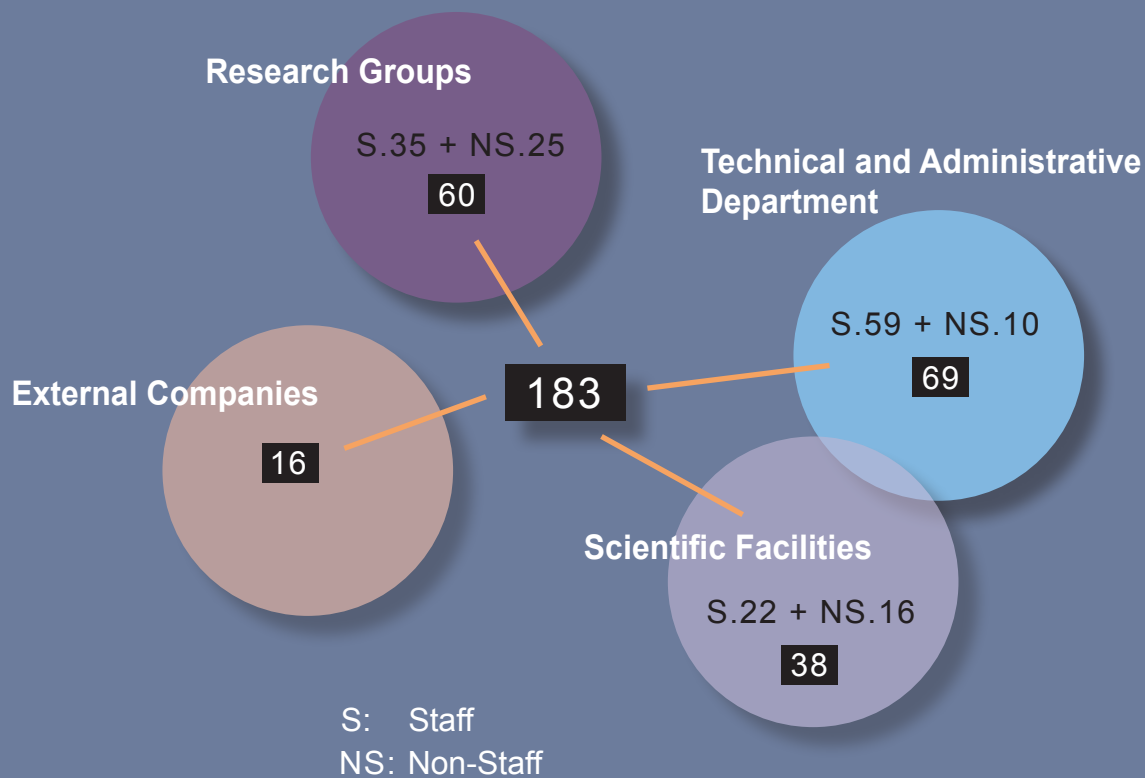
10
Groups

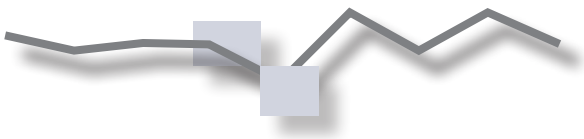
GENOME DYNAMICS AND FUNCTION

Scientific Staff



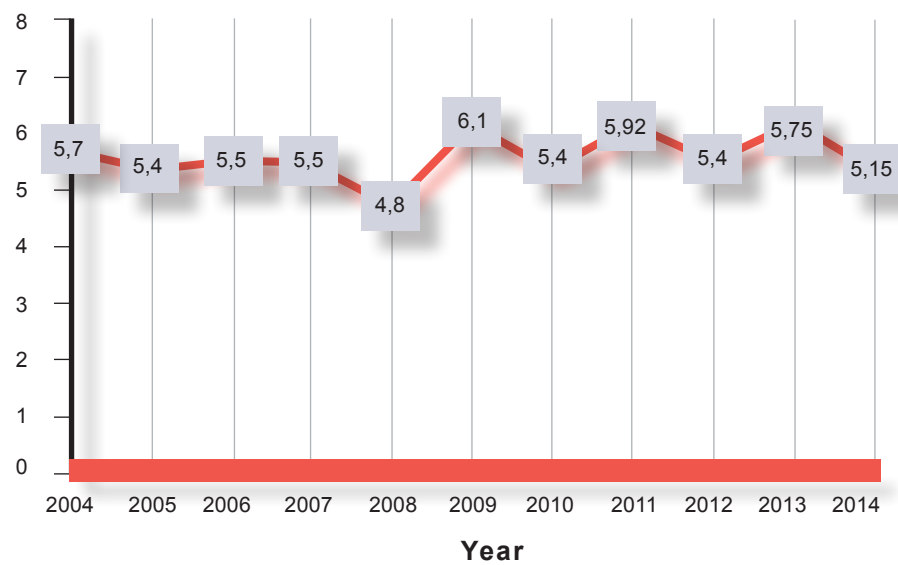
Administrative Staff





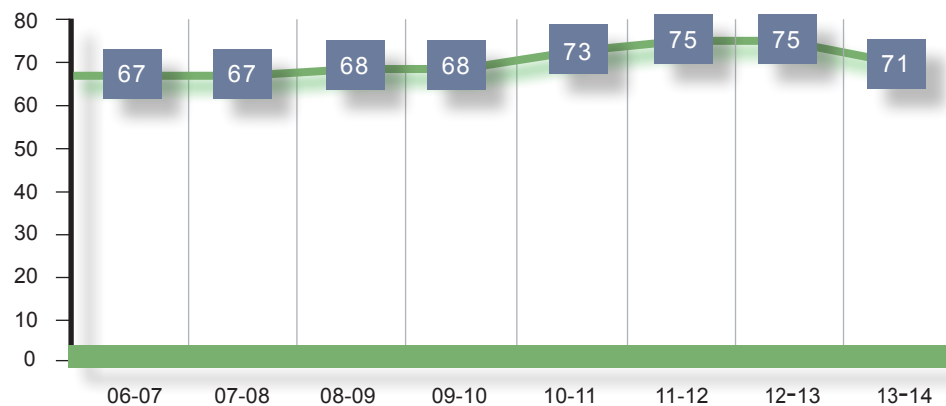
Average Impact Factor

2004-2014



Research Lines

2006-2014



Awards and Honors

2013

MARGARITA SALAS FALGUERAS

Premio Ferrer Internacional Homenot de la Sanidad
(Fundación Avedis Donabedian-UAB)

Premio Madri+d 2012 a la mejor patente
(M. Salas, L. Blanco, Miguel de Vega, J.M. Lázaro, M. Mencia)

Miembro de Honor del Senatium Científico de la Facultad de Ciencias
de la Universidad de Zaragoza

JOSÉ FERNÁNDEZ PIQUERAS

Presidente del Comité Asesor de Expertos de FARPE y FUNDALUCE
(desde Julio de 2013)

Miembro del Instituto de Investigación Sanitaria Jiménez Díaz (IIS-FJD)
(desde Julio de 2013)

2014

MARGARITA SALAS FALGUERAS

Premio a la Excelencia Química 2014 concedido por el Consejo General
de Colegios Oficiales de Químicos de España

FRANCISCO SOBRINO

III Premio Isabel Mínguez Tudela a la Innovación en Sanidad Animal. (Vet+i). 2014
Diploma por méritos científicos durante el curso académico 2013-2014. CSIC

MARTA NAVARRETE LLINAS

Concesión ayuda a Jóvenes Investigadores Innovadores BBVA

JOSÉ J. LUCAS LOZANO

Premio BBVA Fronteras del Conocimiento Proyecto de Biomedicina

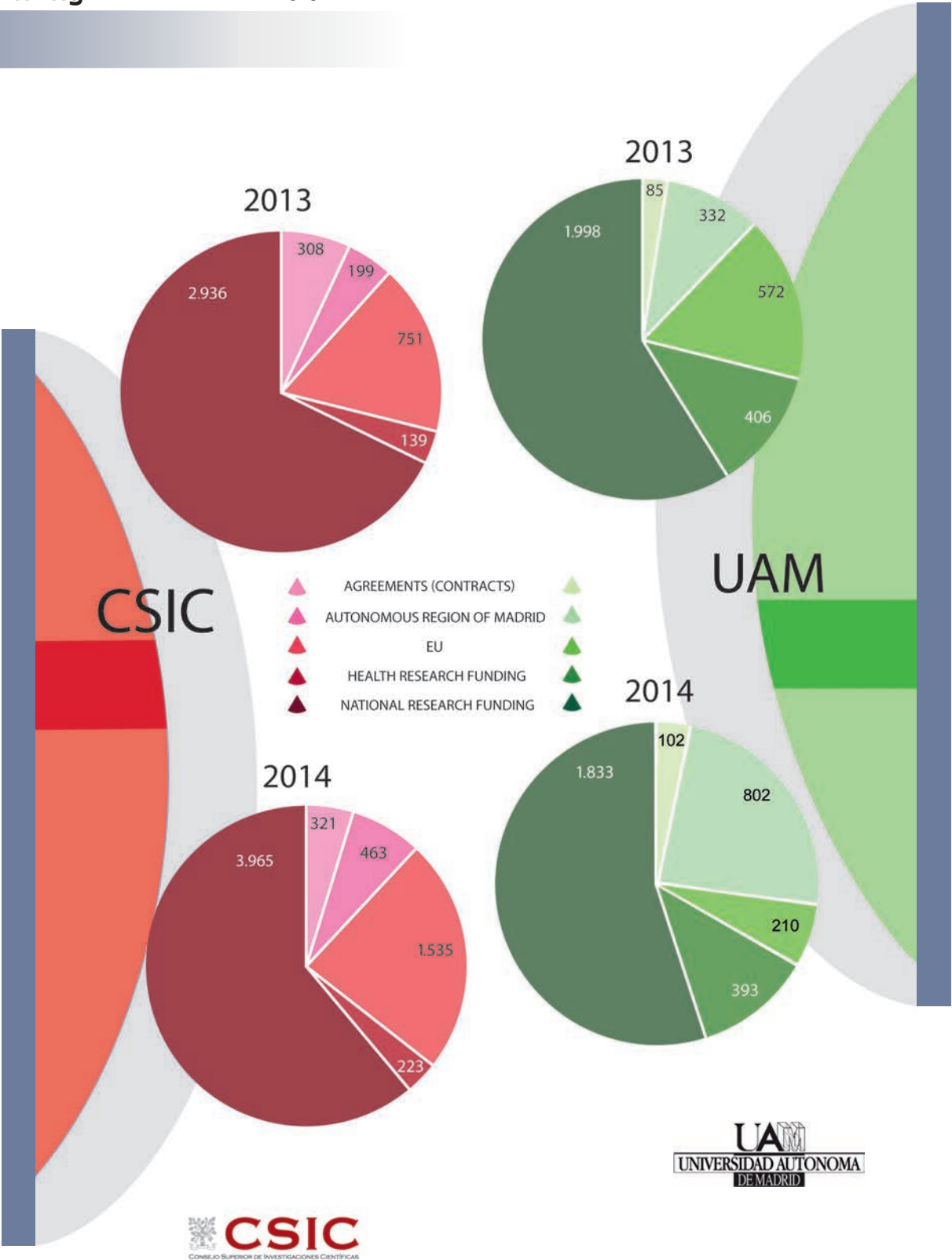
LUIS BLANCO DÁVILA

Premio Carmen y Severo Ochoa 2014 de Investigación en Biología Molecular

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 (*)



* Figures in thousand of euros

Scientific Services

ANIMAL FACILITY

BIOINFORMATICS FACILITY

ELECTRON MICROSCOPY FACILITY

FERMENTATION FACILITY

FLOW CYTOMETRY FACILITY

GENOMICS AND NEXT-GENERATION SEQUENCING FACILITY

OPTICAL AND CONFOCAL MICROSCOPY FACILITY

PROTEOMICS AND PROTEIN CHEMISTRY CORE FACILITY

TRANSGENESIS FACILITY

Technical Services

BIOLOGICAL SECURITY

CROPS, WASHING AND STERILIZATION

COMPUTING SERVICES

GRAPHIC DESIGN / PHOTOGRAPHY

INSTRUMENTATION

LIBRARY

SAFETY AND OCCUPATIONAL RISK PREVENTION

Administrative Services

ADMINISTRATION

HUMAN RESOURCES

INSTITUTIONAL RELATIONS

GENERAL SERVICES

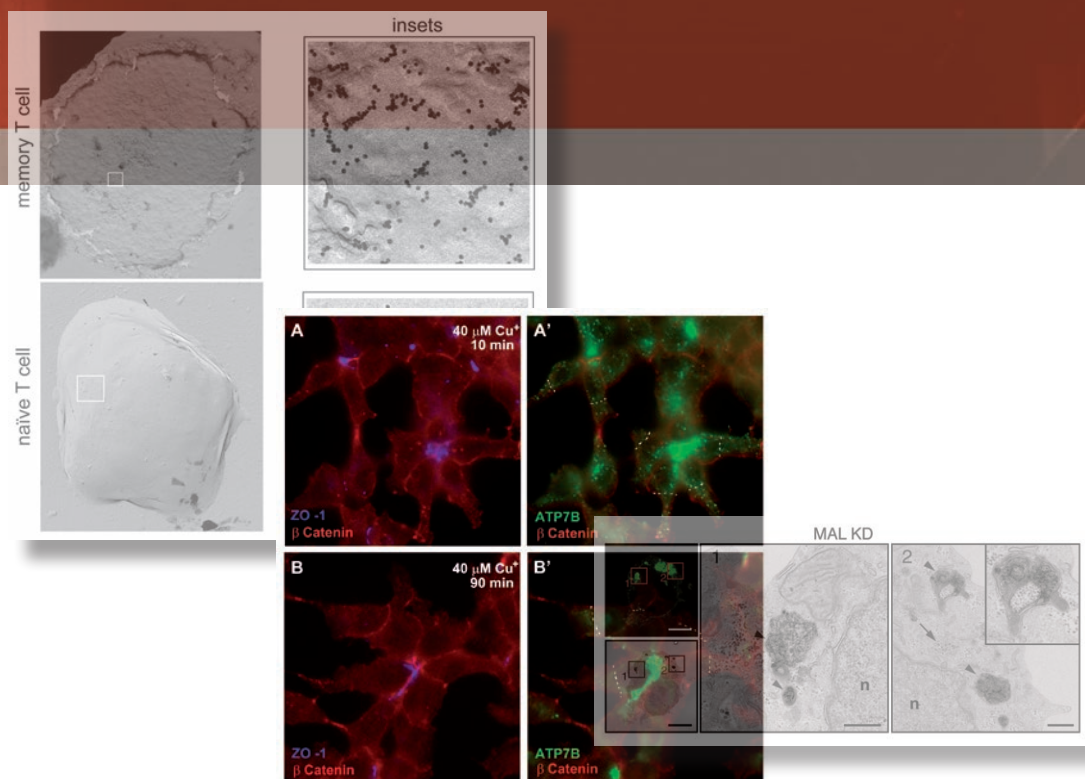
PURCHASING AND STOCKROOM

RECEPTION

- 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 Tráfico de membranas
Membrane trafficking
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 Fisiopatología mitocondrial
Mitochondrial pathophysiology
SUSANA CADENAS ÁLVAREZ
- 26 Plasticidad Celular en Desarrollo y Cáncer
Cellular Plasticity in Development and Cancer
CÉSAR COBALEDA HERNÁNDEZ
- 28 Interacción entre el citoesqueleto y la membrana plasmática
Cytoskeleton-plasma membrane interactions
ISABEL CORREAS HORNERO
- 30 Biogénesis y función de la mitocondria y su repercusión en patología
Biogenesis and function of mitochondria and its role in pathology
JOSÉ M. CUEZVA
- 32 Inmunología Viral
Viral Immunology
MARGARITA DEL VAL LATORRE
- 34 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
JOSÉ FERNÁNDEZ-PIQUERAS
- 36 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
- 38 Acciones de los prostanoideos en procesos inflamatorios
Prostanoids Actions in Inflammatory Processes
MIGUEL ÁNGEL ÍÑIGUEZ PEÑA
- 40 Bases moleculares y celulares de la fisiopatología asociada a la expresión de antígenos intracelulares
Molecular and cellular basis of the physio(patho)logy associated with the expression of intracellular antigens
JOSÉ MARÍA IZQUIERDO JUÁREZ
- 42 Fisiopatología Molecular de la Fibrosis
Molecular Pathophysiology of Fibrosis
SANTIAGO LAMAS PELÁEZ
- 44 Grupo de Fisiopatología Molecular de la Inflamación y Fibrosis Peritoneal (PERINFIB)
Group for the Study of Peritoneal Inflammation and Fibrosis Molecular Pathophysiology
MANUEL LÓPEZ CABRERA
- 46 Inmunología de los antígenos de la histocompatibilidad
Immunology of human histocompatibility antigens
JOSÉ A. LÓPEZ DE CASTRO ÁLVAREZ
- 48 Mecanismos de señalización y regulación de receptores acoplados a proteínas G
G protein-coupled receptor networks: signal transduction and pathophysiological implications
FEDERICO MAYOR
- 50 Biología celular de la inflamación
Cell biology of inflammation
JAIME MILLÁN MARTÍNEZ
- 52 Papel del remodelado de la matriz extracelular en el sistema cardiovascular
Extracellular matrix remodeling in the cardiovascular system
FERNANDO RORÍQUEZ PASCUAL
- 54 Homeostasis metabólica
Metabolic homeostasis
IGNACIO VICENTE-SANDOVAL
- 56 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
- 58 Desarrollo del sistema linfohematopoyético humano
Development of the human lymphohematopoietic system
MARÍA L. 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

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

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Raquel Blanco
Elena Fernández-Arenas
Diana Reyes
Nadia Martín

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

Viola Boccasavia
Elena Rodríguez

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:
Valentina Blanco
Irene Arellano
Tania Gómez
Cristina Prieto

Estudiantes / Undergraduate Students:
Lorena Belén
Almudena Barbero
Julia Ramírez
Celia Alda
Celia Navas
Laura Higuera

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 respuesta 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.

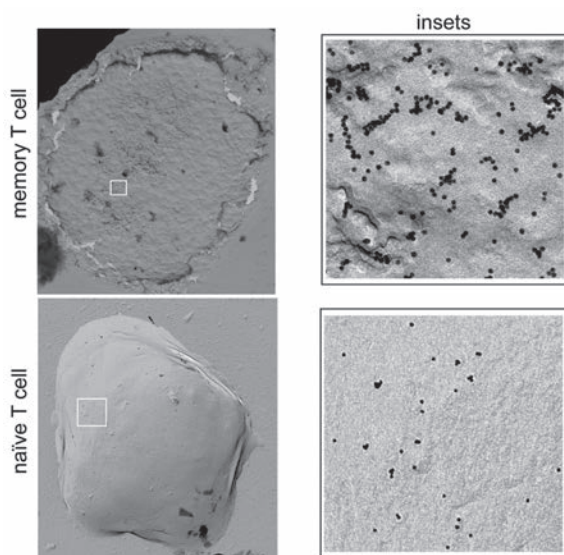


Figura 1. Distribución del TCR en linfocitos naïf y de memoria. Se muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión de replicas de la superficie de un linfocito T CD8+ y de otro de memoria tras el marcaje con anticuerpo anti-CD3 y proteína A-oro de 10 nm.

Figure 1. Distribution of the TCR in naïve and memory T cells. Cell surface replicas of CD8+ naïve and memory T cells examined by transmission electron microscopy after labeling with anti-CD3 and protein A-gold of 10 nm.

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 μ M. 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 of TC21, a member of the R-Ras 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

Tugendreich, S., Bassett, D. E., McKusick, V. A., Boguski, M. S. and Hieter, P. (1994) Genes conserved in yeast and humans. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1509-1517.

Borrito, A., Arellano, I., Dopfer, EP, Prouza, M., Suchanek, M., Fuentes, M., Orfao, A., Schamel, WW., and Alarcón, B. (2013). Nck recruitment to the TCR required for ZAP70 activation during thymic development. *J. Immunol.* **190**, 1103-1112.

Menacho-Márquez M, García-Escudero R, Ojeda V, Abad A, Delgado P, Costa C, Ruiz S, Alarcón B, Paramio JM, and Bustelo XR. (2013). The rho exchange factors vav2 and vav3 favor skin tumor initiation and promotion by engaging extracellular signaling loops. *PLoS Biol.* **11**(7), e1001615.

Schamel, WWA and Alarcón, B. (2013). Organization of the resting TCR in nanoscale oligomers. *Immunol. Rev.* **251**, 13-20.

Ferez M, Castro M, Alarcon B, and van Santen HM. (2014). Cognate peptide-MHC complexes are expressed as tightly apposed nanoclusters in virus-infected cells to allow TCR crosslinking. *J. Immunol.* **192**, 52-58.

Fernández-Arenas E, Calleja E, Martínez-Martín N, Gharbi SI, Navajas R, García-Medel N, Penela P, Alcamí A, Mayor F, Albar JP and Alarcón B. (2014). β -arrestin-1 mediates the TCR-triggered re-routing of distal receptors to the immunological synapse by a PKC-mediated mechanism. *EMBO J.* **33**, 559-577.

Borrito A, Arellano I, Fuentes M, Orfao A, Dopfer EP, Prouza M, Suchanek M, Schamel WW, and Alarcón B. (2014). Relevance of Nck-CD3 ϵ interaction for T Cell Activation *In Vivo*. *J. Immunol.* **192**, 2041-2053.

Larive RM, Moriggi G, Menacho-Márquez M, Cañamero M, Alava Ed, Alarcón B, Dosil M, and Bustelo XR. (2014). Contribution of the R-Ras2 GTP-binding protein to primary breast tumorigenesis and late-stage metastatic disease. *Nat Commun.* **5**, 3881.

Dopfer EP, Hartl FA, Oberg HH, Siegers GM, Yousefi OS, Kock S, Fiala GJ, Garcillán B, Sandstrom A, Alarcón B, Regueiro JR, Kabelitz D, Adams EJ, Minguet S, Wesch D, Fisch P, and Schamel WW. (2014). The CD3 Conformational Change in the $\gamma\delta$ T Cell Receptor Is Not Triggered by Antigens but Can Be Enforced to Enhance Tumor Killing. *Cell Rep.* **7**, 1704-15.

Blanco, R., Borrito, A., Schamel, W.W., Pereira, P. and Alarcón, B. (2014). TCR/Nck-dependent and -independent signals establish T cell lineage decisions beyond the $\alpha\beta/\gamma\delta$ divergence. *Sci. Signal.* **7**(354), ra115.

Castro M, van Santen HM, Ferez M, Alarcón B, Lythe G, and Molina-París C. (2014). Receptor pre-Clustering and T cell Responses: Insights into Molecular Mechanisms. *Front. Immunol.* **5**, 132.

Borrito A, Abia D, and Alarcón B. (2014). Crammed signaling motifs in the T-cell receptor. *Immunol Lett.* **161**, 113-117.

Tesis doctorales / Doctoral theses

María Férrez Ruiz (2013). Existencia de oligómeros preformados de MHC y TCR y su implicación en la sensibilidad de la respuesta de los linfocitos T. Universidad Autónoma de Madrid. Hisse M. van Santen and Balbino Alarcón.

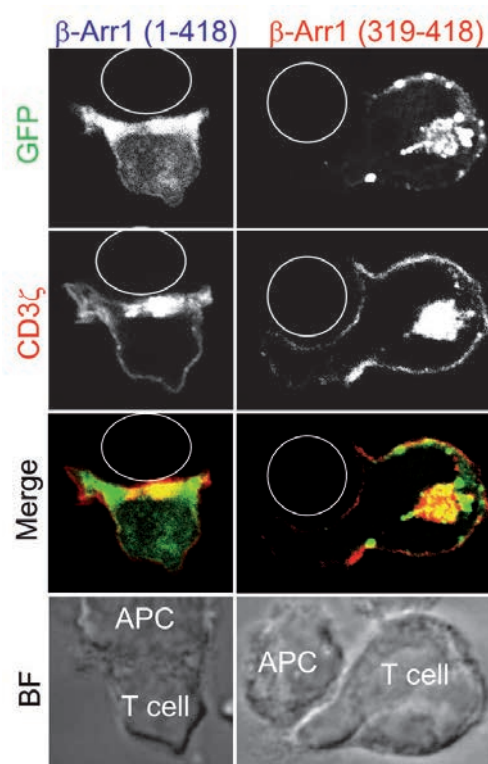


Figura 2. β -arrestina-1 completa [β Arr1-(1-418)] colocaliza con el TCR en la sinapsis inmunológica mientras que la expresión de un mutante dominante negativo [β Arr1-(319-418)] resulta en la retención intracelular del TCR. Las construcciones de β -arrestina-1 están fusionadas a GFP (verde); el TCR se visualiza mediante la proteína de fusión CD3 ζ -Cherry (rojo).

Figure 2. Full length β -arrestin-1 [β Arr1-(1-418)] colocalizes with the TCR at the immunological synapse, whereas expression of a dominant negative mutant [β Arr1-(319-418)] traps the TCR in intracellular compartments. β -arrestin-1 constructs are fused to GFP (green); the TCR is visualized through the CD3 ζ subunit fused to Cherry (red).

Tráfico de membranas

Membrane trafficking



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

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Laura Andrés Delgado
Elena Reales Rodríguez

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Leandro N. Ventimiglia
Sandra Ballester Beltrán
Miguel Bernabé Rubio
Jaime Fernández Barrera
Javier Casares Arias

Estudiantes / Undergraduate Students:
Leticia Labat Lahoz

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:
Laura Fernández

Resumen de investigación

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 hemos utilizado como sistemas celulares modelo linfocitos T y células epiteliales polarizadas. En nuestros estudios ponemos un énfasis especial en la caracterización funcional de las rutas de transporte especializadas mediadas por miembros de la familia MAL de proteínas y proteínas asociadas a éstas.

El cilio primario es un apéndice solitario que emerge de la superficie celular en la mayoría de las células de los vertebrados. El cilio primario controla una gran variedad de rutas de señalización como las reguladas por Hedgehog, Wnt, Notch. No es de extrañar por lo tanto que los defectos en el funcionamiento del cilio primario se reflejen en una lista larga de desórdenes degenerativos y en el desarrollo, que colectivamente se denominan ciliopatías. Uno de nuestros hallazgos principales ha sido el papel que tiene la proteína MAL regulando la condensación de las membranas en la base del cilio primario de células epiteliales.

Los exosomas son vesículas extracelulares de 40-100 nm de diámetro de origen endosomal capaces de transferir biomoléculas desde células donadoras a células receptoras para modular su actividad. Los exosomas se generan como vesículas intraluminales (VILs) en endosomas multivesiculares (EMVs) que tras fusionarse con la membrana plasmática son secretadas al exterior celular. Además de este papel, los EMVs suministran VILs a los lisosomas para la degradación de proteínas ubiquitinadas. Una cuestión importante es comprender cómo se decide el destino exosomal o lisosomal de las VILs. Nuestro grupo ha encontrado que la proteína MAL es esencial para la secreción de exosomas en linfocitos T e impide que las VILs destinadas a ser exosomas sean desviadas a los lisosomas. De esta forma, la proteína MAL regula la ruta constitutiva de secreción de exosomas en linfocitos T y también la inducida por la proteína Nef del virus VIH-1.

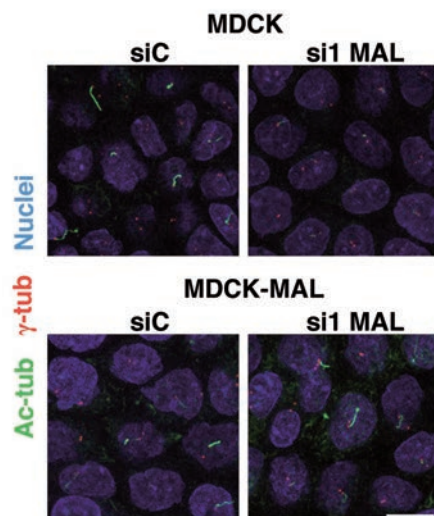


Figura 1. Efecto del silenciamiento de MAL sobre la formación del cilio primario. Células MDCK control y células MDCK que expresan proteína MAL exógena fueron silenciadas para la proteína MAL endógena. Las células fueron teñidas para α -tubulina y γ -tubulina para visualizar el cilio primario y el centrosoma, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se observó una disminución acusada en el número de cilios en las células silenciadas para MAL pero no en las células que expresaban proteína MAL exógena resistente al silenciamiento.

Figure 1. MAL regulates primary ciliogenesis. Control or MDCK cells stably expressing human MAL (MDCK-MAL) were transfected with the indicated siRNA. Cells were then stained for acetylated-tubulin (Ac-tub), γ -tubulin to visualize the primary cilium and the centrosome, respectively. Nuclei were stained with DAPI. The number of primary cilia dramatically decreased in MAL knockdown cells but not in the cells that express MAL protein resistant to the siRNA used.

Research summary

Our group's aim is to advance our knowledge of polarized membrane trafficking through the functional characterization of the protein machinery involved in this process. Special emphasis is placed on the functional characterization of the specialized membrane trafficking pathways of polarized epithelial cells and T lymphocytes that are mediated by members of the MAL protein family and their associated proteins. In the last two years we have focused our research on investigating the role of MAL in two distinct membrane trafficking-mediated processes: primary cilium formation by epithelial cells, and exosome biogenesis by T cells.

The primary cilium is a single appendage that projects from the cell surface in most vertebrate cells. Important signaling pathways involved in cell proliferation, differentiation, survival and migration, such as Hedgehog, Wnt, Notch, signaling, are orchestrated in the primary cilium. Dysfunction of the primary cilium is associated with a large list of human developmental and degenerative disorders, collectively named as ciliopathies, that affect nearly every major body organ. One of our major recent achievements has been the discovery of the involvement of MAL in the organization of condensed membranes or rafts at the ciliary base of renal epithelial MDCK cells.

Exosomes are 40-100-nm extracellular vesicles of endosomal origin that transfer biomolecules from donor cells to recipient cells to modulate their activity. Exosomes are generated as intraluminal vesicles (ILVs) in multivesicular endosomes (MVEs) that, after fusing with the plasma membrane, are secreted into the extracellular space. In addition, MVEs also deliver ILVs into lysosomes for cargo degradation. A key point is to understand how MVEs decide the fate of the ILVs. We have found that MAL expression is essential for efficient secretion of exosomes by T cells and prevent cargo destined for exosomes from being diverted to lysosomes. In this way, MAL mediates the constitutive route of exosome biogenesis. This route is also used for HIV-1 Nef-induced massive exosome release.

Publicaciones / Publications

Aranda, J. F., Reglero-Real, N., Marcos-Ramiro, B., Ruiz-Sáenz, A., Fernández-Martín, L., Bernabé-Rubio, M., Kremer, L., Ridley, A. J., Correas, I., Alonso, M. A.*, and Millán, J.* (2013) MYADM controls endothelial barrier function through ERM-dependent regulation of ICAM-1 expression. *Mol. Biol. Cell* **24**, 483-494 (* equal contribution).

Ventimiglia, L. N., and Alonso, M. A. (2013) The role of membrane rafts in Lck transport, regulation and signalling in T-cells. *Biochem. J.* **454**, 169-79.

Soares, H., Henriques, R., Sachse, M., Ventimiglia, L., Alonso, M. A., Zimmer, C., Thoulouze, M.-I., and Alcover, A. (2013) Regulated vesicle fusion generates signaling nanoterritories that control T cell activation at the Immunological synapse. *J. Exp. Med.* **210**, 2414-2433.

Ruiz-Saenz, A., van Haren, J., Sayas, C. L., Rangel, L., Demmers, J., Millán, J., Alonso, M. A., Galjart, N., and Correas, I. (2013) Protein 4.1R binds to CLASP2 and regulates dynamics, organization and attachment of microtubules to the cell cortex. *J. Cell Sci.* **126**, 4589-601.

Andrés-Delgado, L., Antón, O. M., and Alonso, M. A. (2013) Centrosome polarization in T cells: a task for formins. *Front. Immunol.* **4**, 191.

Reglero-Real, N., Alvarez-Varela, A., Cernuda-Morollón, E., Feito, J., Marcos-Ramiro, B., Fernández-Martín, L., Gómez-Lechón, M. J., Muntané, J., Sandoval, P., Majano, P. L., Correas, I., Alonso, M. A., and Millán, J. (2014) Apicobasal polarity controls lymphocyte adhesion to hepatic epithelial cells. *Cell Rep.* **8**, 1879-93.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Leandro N. Ventimiglia (2014) MAL regula la secreción de exosomas en células T. Sobresaliente cum laude con Mención Europea. Univ. Autónoma de Madrid.

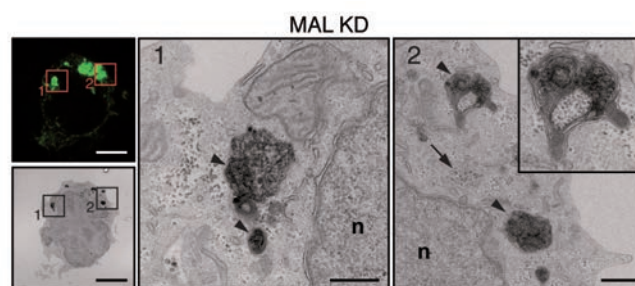


Figura 2. Se transfectaron células T Jurkat silenciadas para la expresión de MAL con CD63-GFP y se analizaron por microscopía electrónica correlativa. Los paneles de la izquierda muestran las secciones obtenidas por microscopía confocal y sus secciones físicas equivalentes. Barra de tamaño, 5 μ m. El resto de los paneles muestran el análisis por microscopía electrónica a mayores aumentos. Barra de tamaño, 500 nm. Las flechas indican EMV y las cabezas de flecha señalan a lisosomas y vacuolas autofágicas. N, núcleo; g, Golgi. (En colaboración con Germán Andrés, Unidad de Microscopía Electrónica del CBMSO).

Figure 2. Jurkat T cells knocked down for MAL transiently expressing CD63-GFP were fixed and processed for correlative light-EM microscopy. The left panels show the confocal section and the equivalent physical section. Scale bar, 5 μ m. The other panels show the EM analysis of the boxed regions at higher magnification. Scale bar, 500 nm. The arrows point to MVE and the arrowheads to lysosomes and autophagic vacuoles. n, nucleus; g, Golgi. (Collaboration with Germán Andrés, Electron Microscopy Unit of the CBMSO).

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

Estudiantes / Undergraduate Students:
Jenny Molina Estupiñán
Ana Uribarri Cisneros
Laura Galán Pérez
Miguel Castillo Herrera
Bárbara Briega
Leticia Olavarri

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.

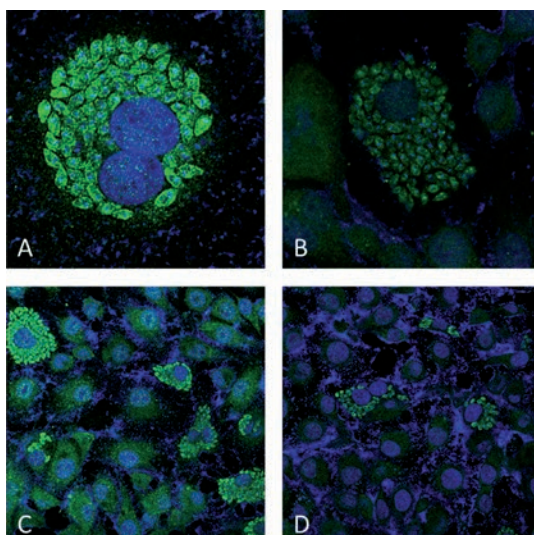


Figura 1. Amastigotes de *T. cruzi* “secuestran” el “pool” intracelular de galectinas. Células LLC-MK2 creciendo en cubreobjetos se infectaron con Tripomastigotes de *T. cruzi*. 4 días post-infección, las células se procesaron para inmunofluorescencia empujando anticuerpos específicos anti-galectina-1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

De la Fuente H, Cruz-Adalia A, Martínez Del Hoyo G, Cibrián-Vera D, Bonay P, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Navarro P, Gutierrez-Gallego R, Ramírez-Huesca M, Martín P, Sánchez-Madrid F. The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Mol Cell Biol*. 2014 Jul;**34**(13):2479-87.

Ramírez L, Corvo L, Duarte MC, Chávez-Fumagalli MA, Valadares DG, Santos DM, de Oliveira CI, Escutia MR, Alonso C, Bonay P, Tavares CA, Coelho EA, Soto M. Cross-protective effect of a combined L5 plus L3 *Leishmania* major ribosomal protein based vaccine combined with a Th1 adjuvant in murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2014 Jan **2**:73.

Leskela S, Rodríguez-Muñoz A, de la Fuente H, Figueroa-Vega N, Bonay P, Martín P, Serrano A, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R, Marazuela M. Plasmacytoid dendritic cells in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jul;**98**(7):2822-33.

Ramírez L, Santos DM, Souza AP, Coelho EA, Barral A, Alonso C, Escutia MR, Bonay P, de Oliveira CI, Soto M. Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the *Leishmania* major recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 2013 Feb **31**(9):1312-9.

Magalhães RD, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Menezes-Souza D, Régis WC, Manso Alves MJ, Soto M, Tavares CA, Nagen RA, Coelho EA. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Apr **3**;8(4):e2764.

Costa LE, Lima MI, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Martins VT, Duarte MC, Lage PS, Lopes EG, Lage DP, Ribeiro TG, Andrade PH, de Magalhães-Soares DF, Soto M, Tavares CA, Goulart LR, Coelho EA. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania* infantum antigens with potential serodiagnosis applications. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Jan;**21**(1):96-106.

Iniesta V, Belinchón-Lorenzo S, Soto M, Fernández-Cotrina J, Muñoz-Madrid R, Monroy I, Baz V, Gómez-Luque A, Parejo JC, Alonso C, Nieto LC. Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania* major infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Trop*. 2013 Dec;**128**(3):468-72.

Souza AP, Soto M, Costa JM, Boaventura VS, de Oliveira CI, Cristal JR, Barral-Netto M, Barral A. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PLoS One*. 2013 Jun **12**;8(6):e66110.

Santos DM, Carneiro MW, de Moura TR, Soto M, Luz NF, Prates DB, Irache JM, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M, Espuelas S, Borges VM, de Oliveira CI. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of *Leishmania*. *Nanomedicine*. 2013 Oct;**9**(7):985-95.

Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Testasica MC, Lage DP, Costa LE, Lage PS, Duarte MC, Ker HG, Ribeiro TG, Carvalho FA, Régis WC, Dos Reis AB, Tavares CA, Soto M, Fernandes AP, Coelho EA. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania* infantum infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. *Clin Vaccine Immunol*. 2013 Jun;**20**(6):835-41.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Laura Ramírez García (2014). El Ribosoma de *Leishmania* y su interacción con el sistema inmune del hospedador. Universidad Autónoma de Madrid. Manuel Soto Álvarez.

Otras actividades / Other activities

Nombramientos:

Carlos Alonso

Nombrado Académico Correspondiente de la Academia Nacional de Medicina de México.

Nombrado Académico Correspondiente de la Academia Europea de Ciencias Artes y Letras (AESAL).

Pedro Bonay

Representante Español en "International Glycoconjugate Organization", afiliada a IUPAC.

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

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:

Raquel Reyes Manzanas
Yessenia Machado Pineda
Nouf Mohammed Almalki
Beatriz Cardeños Pérez

Resumen de investigación

La tetraspanina CD9 interacciona con numerosas proteínas de la superficie celular y a través de estas interacciones regula procesos celulares cruciales como la adhesión, migración, invasión y proliferación. ADAM17/TACE es una proteasa responsable del “shedding” de ectodominios de numerosas proteínas de la superficie celular, críticamente implicadas en desarrollo, crecimiento, adhesión, diferenciación y migración de leucocitos y células tumorales. ADAM17/TACE regula 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 la superfamilia de las inmunoglobulinas que media adhesión intercelular a través de interacciones homofílicas y heterofílicas y está implicada en el crecimiento invasivo y metástasis de diferentes tumores. ALCAM es procesado por ADAM17, liberándose una forma soluble de 96 kDa (sALCAM), cuyos niveles circulantes están elevados en pacientes con diferentes tipos de cáncer, sugiriendo la implicación de esta molécula en la motilidad e invasión de las células tumorales.

CD9 regula la adhesión mediada por ALCAM en células tumorales y leucocitarias a través de un doble mecanismo (Figura 1). Por una parte, induce agregación de moléculas de adhesión y favorece su reclutamiento en microdominios “Tetraspanin-Enriched Microdomains” y cambios en avidéz por sus ligandos. Además, CD9 regula negativamente la actividad proteolítica de ADAM17, modulando el balance entre formas de transmembrana y solubles y alterando la actividad de moléculas implicadas en adhesión e inflamación, incluyendo TNF- α , ICAM-1 y ALCAM.

En colaboración con el grupo de la Dra. Esther Lafuente (Fac. Medicina, UCM) hemos estudiado el papel del efector de Rap1, RIAM, en la fagocitosis mediada por la integrina CR3 ($\alpha_M\beta_2$, Mac-1). RIAM es fundamental en la señalización “downstream” de Rap1, y en el reclutamiento de talina necesarios para la activación de receptores CR3 (Figura 2).

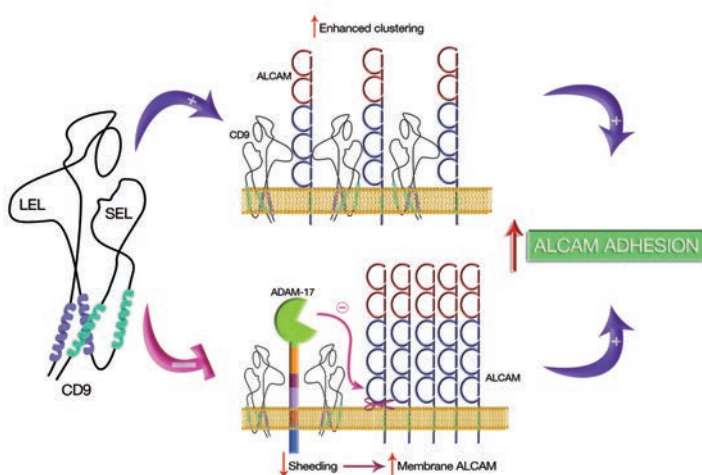


Figura 1. Modelo de regulación funcional por CD9 de la adhesión celular mediada por ALCAM/CD166. Un mecanismo dual cooperativo que comprende, por una parte una agregación aumentada de moléculas de ALCAM/CD166 que aumenta la avidéz de las interacciones de esta molécula y, por otra parte, una expresión incrementada de ALCAM/CD166 debida a la inhibición de la metaloproteínasa ADAM17/TACE, es responsable del aumento de adhesión celular mediada por ALCAM/CD166 inducido por la tetraspanina CD9.

Figure 1. Functional model for the CD9-mediated regulation of ALCAM/CD166-mediated cell adhesion. A cooperative dual mechanism involving on the one hand increased clustering of ALCAM, possibly resulting in enhanced avidity of this molecule, and on the other hand augmented ALCAM surface expression due to inhibition of ADAM17 metalloproteinase activity, contributes to the enhancement of ALCAM-mediated adhesion and function induced by the tetraspanin CD9.

Research summary

The tetraspanin CD9 interacts with many other surface proteins and through these interactions regulates key cellular processes such as adhesion, migration, invasion and proliferation. ADAM17/TACE is a 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 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 that belongs to the immunoglobulin superfamily, mediates cell adhesion through homophilic and heterophilic (ALCAM-CD6) interactions, and is implicated in the invasive growth and metastasis of different types of tumors. ALCAM can be processed by ADAM-17, causing the release of a 96 kDa soluble form (sALCAM). The circulating levels of sALCAM are elevated in patients of different types of cancers, suggesting the implication of this molecule in the motility and invasion of malignant cells.

CD9 regulates ALCAM-mediated cell adhesion of tumoral and leukocytic cells through a dual mechanism (Figure 1). On the one hand, this tetraspanin induces the aggregation of adhesion molecules and promotes their recruitment into microdomains termed “Tetraspanin-Enriched Microdomains” and changes in the avidity of these molecules for their ligands. Additionally, CD9 negatively regulates the proteolytic activity of ADAM-17, thus controlling 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.

In collaboration with the group of Dr. Esther Lafuente (School of Medicine, UCM), we have studied the role of RIAM, an important effector of the small GTPase Rap1, in the phagocytosis mediated by the complement receptor integrin CR3 ($\alpha_M\beta_2$, Mac-1). RIAM plays a crucial role in the downstream signaling from Rap1 and in the recruitment of talin necessary for the activation of CR3 receptors (Figure 2).

Publicaciones / Publications

Sánchez-Martín L, Sánchez-Mateos P, Cabañas C. (2013). CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends in Molecular Medicine* 19:12-22.

Gilsanz A, Sánchez-Martín L, Gutiérrez-López MD, Ovalle S, Machado-Pineda Y, Reyes R, Swart GW, Figdor CG, Lafuente EM, Cabañas C. (2013) ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70:475-93.

Rossi E, Sanz-Rodríguez F, Eleno N, Düwell A, Blanco FJ, Langa C, Botella LM, Cabañas C, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. (2013). Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* 121:403-415.

Medraño-Fernandez I, Reyes R, Olazabal I, Rodríguez E, Sánchez-Madrid F, Boussiotis VA, Reche P, Cabañas C, Lafuente EM. RIAM regulates complement-dependent phagocytosis. (2013). *Cellular and Molecular Life Sciences* 70:2395-410.

Pérez-Rivero G, Cascio G, Fernández-Soriano S, Gilsanz A, Sáez de Guinoa J, Rodríguez-Frade JM, Holgado BL, Cabañas C, Carrasco YR, Stein JV, Mellado M. (2013). Janus kinases 1 and 2 regulate chemokine-mediated integrin activation and naïve T-cell homing. *European Journal of Immunology* 43:1745-57.

Sandoval P, Jiménez-Heffernan JA, Rynne-Vidal A, Pérez-Lozano ML, Gilsanz A, Ruiz-Carpio V, Reyes R, García-Bordas J, Stamatakis K, Dotor J, Majano PL, Fresno M, Cabañas C, López-Cabrera M. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial to mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *Journal of Pathology* 231:517-531.

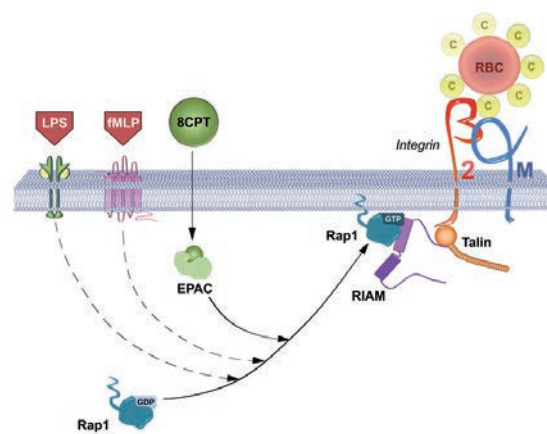
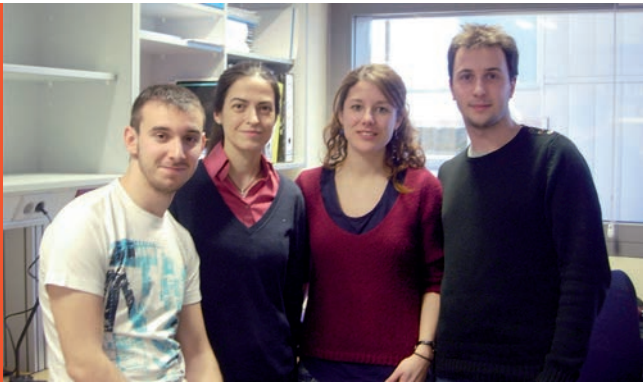


Figura 2. Modelo de la señalización “inside-out” desde Rap1 que conduce a la activación de la integrina CR3 ($\alpha_M\beta_2$) en la fagocitosis mediada por complemento. La activación de receptores agonistas de los productos bacterianos fMLP o LPS inicia cascadas de señalización que promueven el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa Rap1. La forma Rap1-GTP interacciona con su efector RIAM, que a su vez interacciona con talina, favoreciendo el reclutamiento de esta proteína en la proximidad de la integrina $\alpha_M\beta_2$. La cabeza globular de talina, al unirse a la cola intracitoplásmica de la cadena β_2 de la integrina desencadena cambios conformationales en $\alpha_M\beta_2$ que conducen a una forma de alta afinidad por su ligando, el fragmento iC3b del complemento que recubre las partículas a fagocitar. La activación farmacológica de Rap1 mediante tratamiento con 8CPT, un análogo del AMPc que se une directamente a la proteína EPAC, reproduce estos eventos bioquímicos.

Figure 2. Model for the “inside-out” signaling pathway downstream of Rap1 leading to CR3 ($\alpha_M\beta_2$) integrin activation in complement-mediated phagocytosis. Agonist receptor activation by the bacterial products fMLP or LPS initiates signaling cascades that promote the exchange of GDP for GTP in the small GTPase Rap1. Rap1-GTP interacts with its effector RIAM, which in turn interacts with talin recruiting this protein to the proximity of the $\alpha_M\beta_2$ integrin. Talin head binding to the cytoplasmic tail of the integrin β_2 chain triggers structural changes in $\alpha_M\beta_2$ integrin that lead to an increased affinity for its ligand, the iC3b complement fragment that coats phagocytic preys. Pharmacological activation of Rap1 by treatment with 8CPT, an AMPc analogue that binds directly to the protein EPAC, recapitulates these biochemical events.

Fisiopatología mitocondrial

Mitochondrial pathophysiology



Jefe de Línea / Group Leader:
Susana Cadenas Álvarez

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Andrea Anedda

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Elia López Bernardo

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Guillermo Serrano Nájera
Rubén Juvera Pérez

Resumen de investigación

Nuestro grupo estudia la función de las mitocondrias en las células y su implicación en el desarrollo de estados patológicos. Las proteínas desacoplantes (UCPs) constituyen una subfamilia de los transportadores de la membrana mitocondrial interna que modulan la eficiencia energética mediante la regulación de la conductancia de la membrana a los protones. Uno de sus componentes, UCP3, se expresa específicamente en el músculo esquelético, el corazón y el tejido adiposo pardo. Su función fisiológica no está claramente establecida, aunque parece jugar un papel importante en el control de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y en la protección frente al estrés oxidativo. Una respuesta eficiente frente al estrés oxidativo es crucial para la supervivencia celular, y el factor de transcripción Nrf2 es un regulador maestro de las defensas celulares frente a este tipo de estrés.

Durante este periodo hemos estudiado principalmente la regulación de la expresión y la función de UCP3 en respuesta al estrés oxidativo, así como la posible implicación de Nrf2 en este proceso. Hemos encontrado que el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) induce la expresión de UCP3 en células de corazón y músculo esquelético de ratón. Este efecto está mediado por el factor Nrf2. Además, hemos mostrado que la inducción de la proteína UCP3 está acompañada de un aumento en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones, lo que resulta en una menor producción de ROS mitocondriales y, por consiguiente, en una mayor supervivencia celular. También hemos detectado la acumulación nuclear de Nrf2 y un aumento en la expresión de UCP3 en el corazón de ratones sometidos a isquemia-reperfusión, una situación que aumenta la producción de ROS. Estos resultados sugieren que UCP3 podría funcionar como un miembro del sistema de defensas antioxidantes celulares que protege frente al estrés oxidativo *in vivo*.

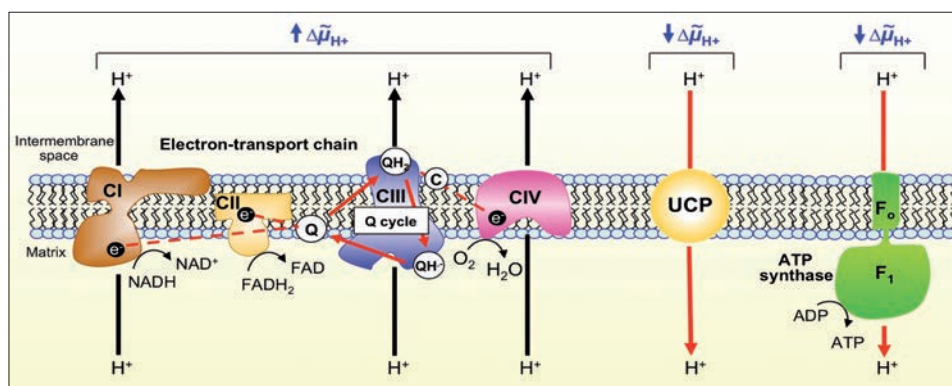


Figura 1. Las proteínas desacoplantes (UCPs) desconectan la oxidación de sustratos de la síntesis de ATP, modulando la eficiencia energética.

Figure 1. Uncoupling proteins (UCPs) disengage substrate oxidation from ATP synthesis thereby modulating energy efficiency.

Research summary

Our group studies the function of mitochondria within cells and their implication in the development of pathological conditions. Uncoupling proteins (UCPs) constitute a subfamily within the mitochondrial inner membrane carriers that modulate energy efficiency by regulating membrane proton conductance. One of its components, UCP3, is specifically expressed in skeletal muscle, heart and brown adipose tissue. Its physiological function is not clearly established, although it seems to play an important role in the control of the production of reactive oxygen species (ROS) and in the protection against oxidative stress. An efficient response to oxidative damage is crucial for cell survival, and the transcription factor Nrf2 is a master regulator of the cellular defences against this type of stress.

During this period, we have mainly studied the regulation of UCP3 expression and function in response to oxidative stress, as well as the possible involvement of Nrf2 in this process. We have found that the treatment with hydrogen peroxide (H_2O_2) induces UCP3 expression in cells from mouse heart and skeletal muscle. This effect is mediated by the transcription factor Nrf2. Moreover, we have shown that the induction of the UCP3 protein is accompanied by an increase in the proton conductance of the inner mitochondrial membrane, which results in a decreased production of mitochondrial ROS and, consequently, in an increased cell survival. In addition, we have detected Nrf2 nuclear accumulation and increased UCP3 protein in intact mouse heart subjected to ischemia-reperfusion, a condition known to increase ROS generation. These results suggest that UCP3 functions as a member of the cellular antioxidant defence system that protects against oxidative stress *in vivo*.

Publicaciones / Publications

Anedda, A., López-Bernardo, E., Acosta-Iborra, B., Suleiman, M.S., Landázuri, M.O. and Cadenas, S. (2013) The transcription factor Nrf2 promotes survival by enhancing the expression of uncoupling protein 3 under conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **61**, 395-407.

Domínguez-Luis, M., Herrera-García, A., Arce-Franco, M., Armas-González, E., Rodríguez-Pardo, M., Lorenzo-Díaz, F., Fera, M., Cadenas, S., Sánchez-Madrid, F. and Díaz-González, F. (2013) Superoxide anion mediates the L-selectin down-regulation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 245-256.

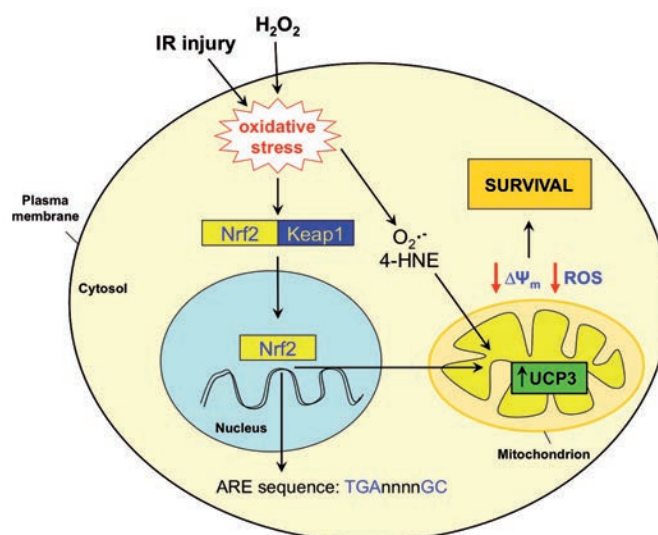
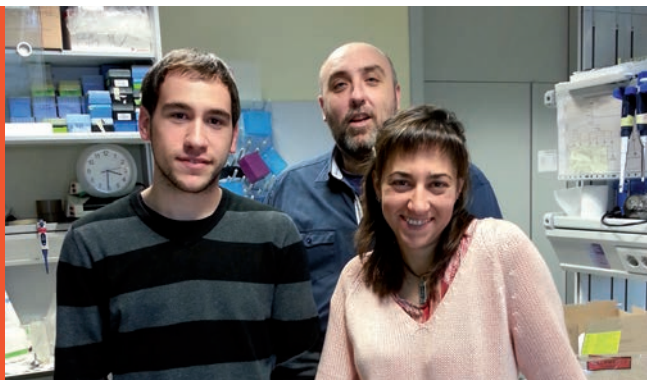


Figura 2. El estrés oxidativo aumenta la expresión de UCP3 vía Nrf2, lo que promueve la supervivencia celular.

Figure 2. Oxidative stress increases UCP3 expression via Nrf2, which promotes cell survival.

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

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Elena Campos Sánchez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Almudena Barbero Castillo
David Fernández Moreno

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.

La hipótesis de las células madre tumorales (el hecho de que el cáncer sea 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. Anteriormente hemos demostrado que se puede inducir el desarrollo tumoral en ratones restringiendo la expresión oncogénica exclusivamente a las células madre iniciadoras del tumor (lo que prueba la capacidad instructiva que los oncogenes tienen sobre la diferenciación celular), y cómo esta acción se ejerce mediante modificaciones epigenéticas. Con este punto de partida, hemos generado ratones modificados genéticamente que expresan, en sus células madre hematopoyéticas, la lesión oncogénica iniciadora de las leucemias linfoblásticas agudas B infantiles (B-ALLs) humanas. Con este modelo estamos estudiando, dentro del consorcio multinacional Europeo ARIMMORA (<http://arimmora-fp7.eu/>), el posible papel que la exposición a campos electromagnéticos de muy baja frecuencia pudiera tener en el desarrollo de las B-ALLs. Simultáneamente, estudiando la leucemia mieloide crónica (CML) hemos descubierto, usando un screening de metilación diferencial a partir de muestras de pacientes, que la metilación de las islas CpG de factores de transcripción necesarios para la progresión de la diferenciación hematopoyética conlleva un bloqueo de la diferenciación en los linajes que requieren esos factores para su desarrollo, y esto desencadena la progresión de la enfermedad a la crisis blástica. Usando nuestro modelo de ratón de CML junto con ratones KO de los genes identificados, hemos podido recapitular en estos animales la progresión de la patología humana.

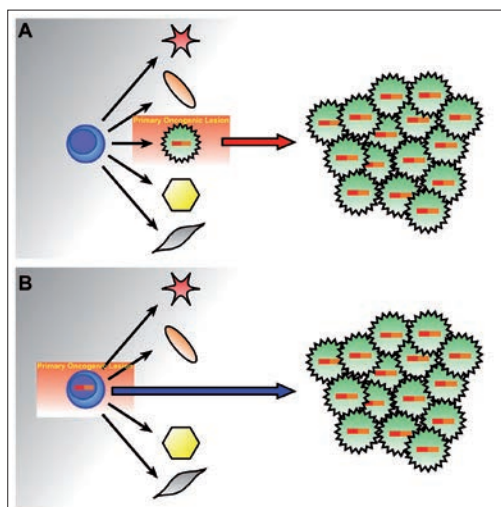


Figura 1. MODELO EXPLICATIVO DEL PAPEL QUE LOS DEFECTOS GENÉTICOS ASOCIADOS AL CÁNCER HUMANO JUEGAN EN LA ESPECIFICACIÓN DEL DESTINO CELULAR. A) Tradicionalmente, se ha pensado que las alteraciones genéticas en el cáncer ocurrían en una célula ya comprometida a un determinado linaje, de forma que el fenotipo tumoral venía determinado por las características de dicha célula diana diferenciada original. B) Por el contrario, los descubrimientos más recientes apoyan la idea de que las lesiones oncogénicas actúan al nivel de las células madre/progenitoras de una manera instructiva, imponiendo un determinado programa de diferenciación tumoral dictado por el oncogén a través de una reprogramación epigenética.

Figure 1. PROPOSED MODEL FOR THE ROLE OF HUMAN CANCER GENETIC DEFECTS IN TUMOR CELL FATE SPECIFICATION. A) Traditionally, the human cancer genetic defects have been thought to act on cells already committed to a differentiation program, in such a way that the tumoral phenotype is derived from that of the initial differentiated target cell. B) Alternatively, the latest findings support a view in which the oncogenic lesion acts on stem/progenitor cells in an instructive manner, by imposing a given, oncogene-specific, tumor differentiated cell fate through epigenetic reprogramming.

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.

The cancer stem cell model (postulating that cancer is a hierarchically organized tissue maintained by malignant cancer stem cells) 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 previously demonstrated that it is indeed possible to induce tumor development in the mouse by restricting oncogene expression to the stem/progenitor cells responsible for tumor origin and maintenance. These findings demonstrate the inductive capacity that oncogenes possess to govern cellular differentiation, and how this action is mediated by epigenetic modifications. From this starting point, we have generated genetically engineered mice expressing in their hematopoietic stem cells the oncogenic lesion responsible for the initiation of childhood B acute lymphoblastic leukemias (B-ALLs). Using this model we are studying, in the context of the multinational EU Project ARIMMORA (<http://arimmora-fp7.eu/>), the potential role that extremely low frequency electromagnetic fields might play in the development of B-ALLs. On a different front, studying chronic myelogenous leukemia (CML), we have performed a differential DNA methylation screening using human patient samples. This approach has revealed that the methylation of CpG islands of essential transcription factors required for hematopoietic development leads to a developmental block of the affected lineages that, in turn, triggers the progression of the disease to the blast crisis stage. Afterwards, using our previously published CML mouse model in combination with KO mice of the identified methylated genes, we have been able of recapitulating the progression of the human pathology.

Publicaciones / Publications

Green, M.R., Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., Long Liu, C., Dai, B., González-Herrero, I., García-Ramírez, I., Alonso-Escudero, E., Iqbal, J., Chan, W.C., Campos-Sánchez, E., Orfao, A., Pintado, B., Flores, T., Blanco, O., Jiménez, R., Martínez-Climent, J.A., Criado, F.J., Cenador, M.B., Zhao, S., Natkunam, Y., Lossos, I.S., Majeti, R., Melnick, A., Cobaleda, C., Alizadeh, A.A. and Sánchez-García, I. (2014) Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nat. Commun.* **5**, 3904.

Abollo-Jiménez, F., Campos-Sánchez, E., Toboso-Navasa, A., Vicente-Dueñas, C., González-Herrero, I., Alonso-Escudero, E., González, M., Segura, V., Blanco, O., Martínez-Climent, J.A., Sánchez-García, I., and Cobaleda, C. (2014) Lineage-specific function of Engrailed-2 in the progression of chronic myelogenous leukemia to T-cell blast crisis. *Cell Cycle* **13**, 1717-1726.

Hauer, J., Borkhardt, A., Sánchez-García, I. and Cobaleda, C. (2014) Genetically engineered mouse models of human B-cell precursor leukemias. *Cell Cycle* **13**, 2836-2846.

Laurier, D., Grosche, B., Auvinen, A., Clavel, J., Cobaleda, C., Dehoss, A., Hornhardt, S., Jacob, S., Kaatsch, P., Kosti, O., Kuehni, C., Lightfoot, T., Spycher, B., Van Nieuwenhuysse, A., Wakeford, R. and Ziegelberger, G. (2014) Childhood leukaemia risks: from unexplained findings near nuclear installations to recommendations for future research. *J. Radiol. Prot.* **3**:R53-68.

Campos-Sánchez, E. and Cobaleda, C. (2014) Tumoral Reprogramming: Plasticity Takes a Walk on the Wild Side. BBA Gene Regulatory Mechanisms, Special Issue "Stress as a fundamental theme in cell plasticity" S1874-9399(14)00191-6.

Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., Cobaleda, C.* and Sánchez-García, I.* (*Corresponding authors) (2013) Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. *EMBO Journal* **32**, 1502-1513

Romero-Camarero, I., Jiang, X., Natkunam, Y., Lu, X., Vicente-Dueñas, C., Gonzalez-Herrero, I., Flores, T., Garcia, J.L., McNamara, G., Kunder, C., Zhao, S., Segura, V., Fontan, L., Martínez-Climent, J.A., García-Criado, F.J., Theis, J.D., Dogan, A., Campos-Sánchez, E., Green, M.R., Alizadeh, A.A., Cobaleda, C., Sánchez-García, I. and Lossos, I.S. (2013) HGAL- a Germinal Center Protein, Enhances BCR-mediated Syk Activation, Leading to Lymphoid Hyperplasia and Amyloidosis. *Nat. Commun.* **4**, 1338.

Campos-Sánchez, E., Sanchez-García, I. and Cobaleda, C. (2013) Current concepts of how to eliminate cancer stem cells (Invited Book Chapter). In T. Dittmar, E. Mihich and K.S. Zanker (eds.) Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy. CRC Press, USA pp. 167-199.

Vicente-Dueñas, C., Campos-Sánchez, E., Hourcade, J.D., Romero-Camarero, I., Sanchez-García, I. and Cobaleda, C. (2013) Cancer stem cells and modeling cancer in the mouse (Invited Book Chapter). In Hayat, M.A. (ed.) Stem Cells and Cancer Stem Cells Vol. 9: Therapeutic Applications in Disease and Injury. Springer Science+Business Media, Germany, pp. 227-234.

Cobaleda, C. and Sánchez-García, I. (2013) Back to the beginning: The initiation of cancer. *Bioessays* **35**, 413.

Otras actividades / Other activities

Miembro "ad hoc" del comité de la Oficina Federal Alemana para la Protección contra la Radiación (BfS) encargado 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 committee of the German Federal Office for Radiation Protection (BfS), in charge of defining future research programs on the role of environmental factors in the pathogenesis of childhood leukemia.

Miembro del Comité Organizador del "I International Workshop: Electromagnetic Fields and Biomedicine". Salamanca, Diciembre 2013.

Member of the Organizing Committee of the "I International Workshop: Electromagnetic Fields and Biomedicine". Salamanca, December 2013.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Elena Campos Sánchez (2014). Papel de *Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate-1 (WHSC1)* en desarrollo hematopoyético y función inmune. Universidad Autónoma de Madrid. Director: César Cobaleda.

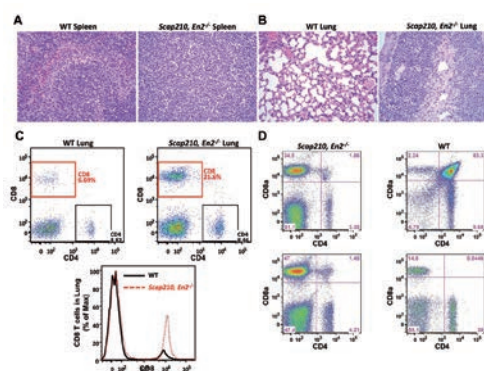


Figura 2. CRISIS BLÁSTICA T DESENCADENADA POR LA AUSENCIA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN *Engrailed-2* EN UN MODELO TRANSGÉNICO DE CML. (A-B) Las células T leucémicas de los ratones *Sca1-BCRABLp210, En2^{-/-}* infiltran tanto órganos hematopoyéticos [bazo, A] como otros órganos [pulmón, B]. (C) Las células que infiltran los pulmones de los animales *Sca1-BCRABLp210, En2^{-/-}* son células T tumorales CD8⁺. (D) Acumulación de células CD8⁺ en el timo y la sangre periférica de los animales *Sca1-BCRABLp210, En2^{-/-}* leucémicos. (De Abollo-Jimenez et al., 2014).

Figure 2. T-CELL BLAST CRISIS TRIGGERED BY THE ABSENCE OF THE TRANSCRIPTION FACTOR *Engrailed-2* IN A CML TRANSGENIC MODEL. (A-B) Leukemic T cells in *Sca1-BCRABLp210, En2^{-/-}* mice infiltrate hematopoietic [spleen, A] and non-hematopoietic [lung, B] tissues. (C) Three-fold increase in the percentage of the infiltrating CD8⁺ T cells in the lungs of *Sca1-BCRABLp210, En2^{-/-}* leukemic mice. (D) Accumulation of CD8⁺ cells in the thymus and peripheral blood of *Sca1-BCRABLp210, En2^{-/-}* leukemic mice. (From Abollo-Jimenez et al., 2014).

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 (Jefe de Línea)
Carlos M. Luque

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Ana Ruiz Sáenz

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Laura Rangel Sánchez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Eva Raimúndez Álvarez (TFG)
Laura Martínez López (TFG)
Catalina López Gutiérrez
(Prácticas externas)

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, 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 que conectan el citoesqueleto subcortical y la membrana plasmática, a través de sus dominios FERM (four-point-one, ezrin-radixin-moesin). En este proceso, es clave la distribución asimétrica de los microtúbulos (MTs). En la mayoría de las células animales los MTs irradian desde el MTOC (Microtubule Organizing Center) y se dirigen hacia la periferia celular donde se anclan a diferentes proteínas ubicadas en las plataformas corticales. Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de proteínas involucradas en estos procesos, sin embargo aún se desconocen todos los componentes implicados. Durante el periodo 2013-2014 hemos centrado nuestra atención en el papel desempeñado por la proteína 4.1R en el anclaje de los microtúbulos por su extremo “más” a las plataformas corticales de las células en migración. El conjunto de los resultados obtenidos indican que 4.1R es un componente de las plataformas corticales y es clave para el establecimiento de la asimetría de los MTs en el frente de avance, asegurando la organización y dinámica correcta de los MTs esencial para la polaridad celular. En colaboración con grupos del CBMSO hemos analizado el papel de las ERMs en la barrera endotelial y en la migración celular. Recientemente hemos comenzado a analizar si 4.1R participa también en el anclaje de los MTs por el extremo “menos” ya que la depleción de 4.1R resulta en la pérdida del anclaje de los MTs al MTOC.

También hemos continuado con la caracterización funcional del ortólogo de las proteínas 4.1 en *Drosophila melanogaster*, la proteína D4.1/coracle. Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren un papel de D4.1/Coracle en mecanismos de supervivencia celular durante el desarrollo de la mosca del vinagre.

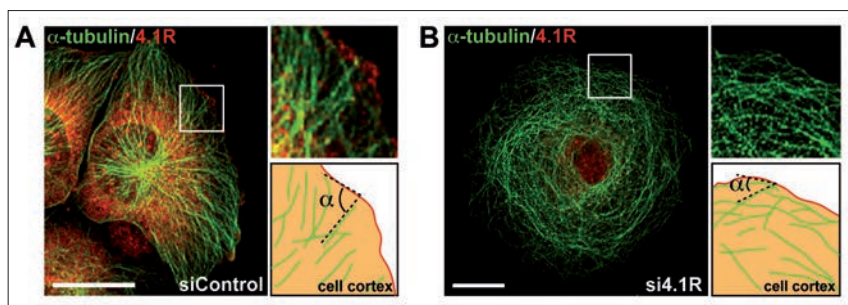


Figura 1. La depleción de la proteína 4.1 altera la organización de los microtúbulos (MTs) celulares. Células control (A) o células deplecionadas para la proteína 4.1 (B) se tiñeron para 4.1 (rojo) y para alfa-tubulina (verde). Las regiones enmarcadas en el frente de avance celular se muestran aumentadas en la parte superior derecha. La orientación de los MTs se determinó midiendo el ángulo formado entre el extremo “más” del MT y el borde celular.

Figure 1. 4.1R knockdown alters MT architecture. Control (A) or 4.1R-KD cells (B) were stained for 4.1R (red) and alpha-tubulin (green). The boxed region of the cell edge is shown enlarged in the upper right panels. MT orientation was determined by measuring the angle between the MT plus-end and the cell edge (lower right panels).

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. Asymmetric microtubule organization is essential for cell migration. Most animal cells present MTs emanating from the MTOC and oriented radially to the cell periphery. Many proteins regulate these processes but it is not well characterized how MTs anchor to the cortical platforms and the protein composition of these structures. During 2013-2014, we have studied the role of 4.1R in anchoring the “plus” ends of MTs to the cortical platforms in migrating cells. Our results suggest a key role of the scaffolding protein 4.1R in establishing MT network asymmetry at the leading edge, thereby ensuring the correct MT organization and dynamics essential for cell polarity. Recently, we are studying the role of 4.1R in anchoring MTs at the MTOC.

We have also continued with the functional characterization of D4.1/Coracle, the only protein 4.1 ortholog in *Drosophila melanogaster*. Results obtained so far suggest a role for D4.1/Coracle in cell survival mechanisms during fly development.

Publicaciones / Publications

Ruiz-Saenz A, van Haren J, Laura Sayas C, Rangel L, Demmers J, Millán J, Alonso MA, Galjart N, Correas I. (2013). Protein 4.1R binds to CLASP2 and regulates dynamics, organization and attachment of microtubules to the cell cortex. *J Cell Sci.* **126**, 4589-601.

Fernández-Espartero CH, Ramel D, Farago M, Malartre M, Luque CM, Limanovich S, Katzav S, Emery G, Martín-Bermudo MD. (2013). GTP Exchange factor Vav regulates guided cell migration by coupling guidance receptor signalling to local Rac activation. *J. Cell Sci.* **126**, 2285-93.

Aranda JF, Reglero-Real N, Marcos-Ramiro B, Ruiz-Sáenz A, Fernández-Martín L, Bernabé-Rubio M, Kremer L, Ridley AJ, Correas I, Alonso MA, Millán J. (2013). MYADM controls endothelial barrier function through ERM-dependent regulation of ICAM-1 expression. *Mol Biol Cell.* **24**, 483-94.

Reglero-Real N, Alvarez-Varela A, Cernuda-Morollón E, Feito J, Marcos-Ramiro B, Fernández-Martín L, Gómez-Lechón MJ, Muntané J, Sandoval P, Majano PL, Correas I, Alonso MA, Millán J. (2014). Apico-basal polarity controls lymphocyte adhesion to hepatic epithelial cells. *Cell Rep.* **8**, 1879-93.

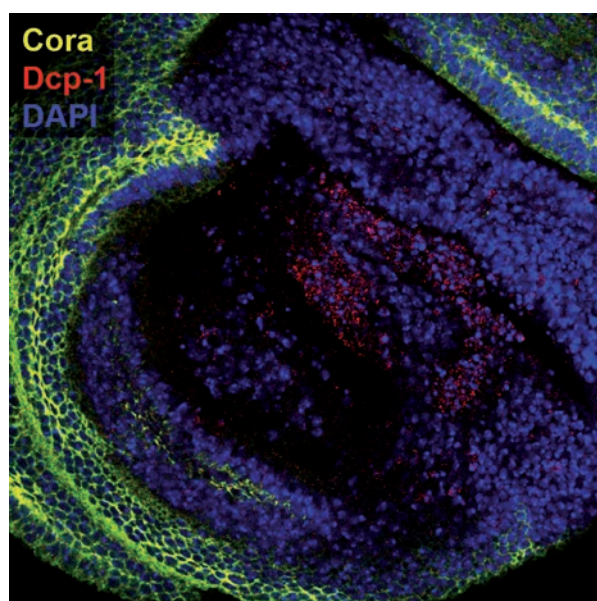


Figura 2. La falta de D4.1/Coracle provoca la muerte celular por apoptosis. Disco imaginal de ala teñido para D4.1/Coracle (Cora: amarillo), activación de caspasas (Dcp-1: rojo) y condensación del ADN nuclear (DAPI: azul).

Figure 2. Loss of D4.1/Coracle causes cell death by apoptosis. Wing imaginal disc stained for D4.1/Coracle (Cora: yellow), active caspases (Dcp-1: red) and nuclear DNA condensation (DAPI: blue).

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

Personal Científico / Scientific Staff:
María Sánchez-Aragó
Laura Formentini

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Inmaculada Martínez Reyes
Noelia Blanco Talaván

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Fulvio Santacatterina
Javier García Bermúdez
Estela Casas López
Carmen Cuevas Martín
Pau Bernat Esparza Moltó

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:
Margarita Chamorro Bello
Cristina Núñez de Arenas Flores

Estefanía Martínez Jover
(MITOLAB Project Manager)

Estudiantes / Undergraduate Students:
David López Martínez
Jorge Arias Vaamonde

Científicos visitantes / Visiting Scientists:
Mariví Cascajo Almenara
(CIBERER, Sevilla)

Adriana Kolesárova y Dajmara Packova
(Universidad de Nitra, Checoslovaquia)
John Freddy Hernández Montaña
(Pontificia Universidad Javeriana, Colombia)
Magdalena Kusaczuk
(Medical University of Bialystok, Polonia)

Resumen de investigación

El 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. Los estudios se centran fundamentalmente en el complejo de la H^+ -ATP sintasa, sistema enzimático cuello de botella para la generación de energía biológica en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y 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 cuya alteración conduce a la expresión de un fenotipo mitocondrial aberrante. Las aportaciones más relevantes de este bienio se pueden resumir en: (i) la identificación del Factor de Inhibición 1 de la ATP sintasa (IF1) como un marcador de células madre cuya degradación media la reprogramación metabólica en la diferenciación celular (Fig. 1); (ii) que los carcinomas humanos más prevalentes sobre-expresan IF1 mediante regulación post-transcripcional siendo IF1 un marcador de progresión de la enfermedad; (iii) que la sobreexpresión de IF1 además de inhibir la OXPHOS y activar la glucólisis aeróbica promueve la señalización al núcleo de vías de supervivencia celular mediante la generación de una señal de especies reactivas de oxígeno (ROS) y (iv) hemos podido demostrar *in vivo*, mediante el desarrollo de ratones transgénicos que expresan de manera regulada una forma activa de IF1 en neurona, que la H^+ -ATP sintasa es parte de la maquinaria requerida para ejecutar la muerte de la célula, constituyéndose de esta manera en una potencial diana terapéutica en procesos de neurodegeneración (Fig. 2).

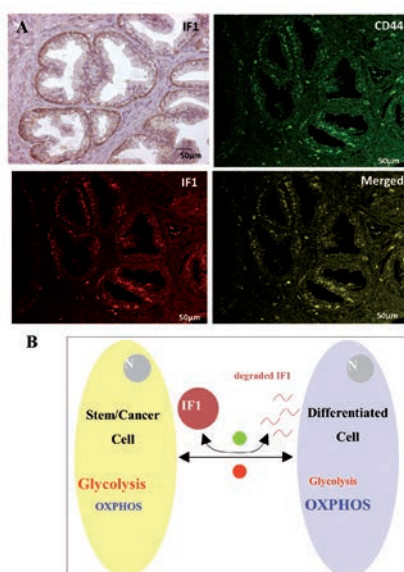


Figura 1. IF1 se expresa en células madre de próstata (A) y su degradación media la reprogramación metabólica que acompaña la diferenciación celular (B) [tomada en parte de EMBO Rep. 14(7), 638-44 (2013)].

Figure 1. IF1 is expressed in prostate stem cells (A) and its degradation mediates metabolic rewiring during cellular differentiation (B) [Taken in part from EMBO Rep.14(7), 638-44 (2013)].

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 primarily 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 special emphasis to the study of the mechanisms that promote an aberrant mitochondrial phenotype. Our main contributions in this two-year period have been: (i) the identification of the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) as a stem cell marker whose degradation mediates metabolic rewiring during cell differentiation (Fig. 1); (ii) that many prevalent human carcinomas over-express IF1 by mechanisms regulated at post-transcriptional levels, further providing the expression level of IF1 a marker of disease progression; (iii) that the over-expression of IF1 not only inhibits OXPHOS promoting the concurrent activation of aerobic glycolysis but in addition generates a mitochondrial reactive oxygen species (ROS) signal that mediates nuclear reprogramming and the activation of cell survival pathways and finally, (iv) we have demonstrated in vivo, by developing transgenic mice that express in a regulated way an active mutant of IF1 in neurons, that the H^+ -ATP synthase is part of the machinery required to execute cell death, thus providing a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases (Fig. 2).

Publicaciones / Publications

Formentini L, Pereira MP, Sánchez-Cenizo L, Santacatterina F, Lucas JJ, Navarro C, Martínez-Serrano A, Cuezva JM. (2014) In vivo inhibition of the mitochondrial H^+ -ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *EMBO J.* **33**(7), 762-78.

Martínez-Reyes I, Cuezva JM. (2014) The H^+ -ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or cell survival. *Biochim Biophys Acta.* **1837**(7), 1099-112.

Cerveira JF, Sánchez-Aragó M, Urbano AM, Cuezva JM. (2014) Short-term exposure of nontumorigenic human bronchial epithelial cells to carcinogenic chromium (VI) compromises their respiratory capacity and alters their bioenergetic signature. *FEBS Open Bio.* **4**, 594-601.

Sánchez-Aragó M, García-Bermúdez J, Martínez-Reyes I, Santacatterina F, Cuezva JM. (2013) Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells. *EMBO Rep.* **14**(7), 638-44.

Sánchez-Aragó M, Formentini L, Martínez-Reyes I, García-Bermúdez J, Santacatterina F, Sánchez-Cenizo L, Willers IM, Aldea M, Nájera L, Juarrán A, López EC, Clófent J, Navarro C, Espinosa E, Cuezva JM. (2013) Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis.* **2**, e46.

Sánchez-Aragó M, Formentini L, Cuezva JM. (2013) Mitochondria-mediated energy adaption in cancer: the H^+ -ATP synthase-gear switch of metabolism in human tumors. *Antioxid Redox Signal.* **19**(3), 285-98.

López-Erauskin J, Galino J, Ruiz M, Cuezva JM, Fabregat I, Cabellos D, Boada J, Martínez J, Ferrer I, Pamplona R, Villarroya F, Portero-Otín M, Fourcade S, Pujol A. (2013) Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in the peroxisomal disease X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet.* **22**(16), 3296-305.

Otras actividades / Other activities

(i) Somos la Unidad 713 del CIBERER, en el campo de Patología Mitochondrial del CIBER de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III.

(ii) Somos la línea "Translation of Energy Metabolism" en el área de Oncología del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12).

(iii) Coordinamos el Consorcio MITOLAB de la Comunidad de Madrid.

(iv) Hemos desarrollado el Servicio PROTEOmAb (FUAM+UAM+CIBER) para la cuantificación de marcadores moleculares de enfermedad y/o de respuesta a terapia basado en tecnología de "Microarrays de Proteínas de Fase Reversa" para grupos básicos y clínicos.

(v) José M. Cuezva, Director del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

Patentes / Patents

1. Autores: Fulvio Santacatterina, María Sánchez Aragón y José M. Cuezva. Título: "Procedimiento y kit de diagnóstico diferencial de una enfermedad que cursa con afectación muscular". Número de Publicación: ES2432653. Fecha de publicación: 14/12/2013. Propietario: Universidad Autónoma de Madrid y CIBERER.

2. Registro de marca: PROTEOmAb. Propietario: Universidad Autónoma de Madrid. Número de marca: 3.055.803. Fecha de solicitud: 12/12/2012. Fecha de publicación: 14/03/2013.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Laura Sánchez Cenizo. 2014. "Función oncogénica del inhibidor de la H^+ -ATP sintasa IF1: desarrollo y caracterización de modelos transgénicos condicionales y tejido-específicos" Universidad Autónoma de Madrid. Director: José M. Cuezva. Sobresaliente "cum laude". Premio de la Real Academia de Doctores a la mejor Tesis Doctoral 2014 en el área de Bioquímica (Premio Juan Abelló Pascual I).

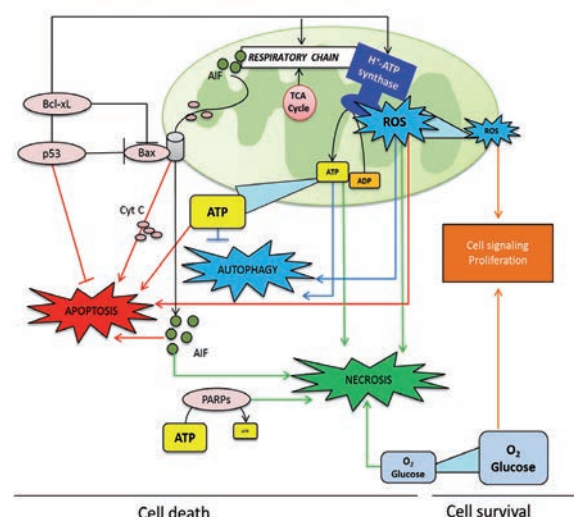


Figura 2. Integración del metabolismo energético y la muerte celular [tomada de Antioxid Redox Signal.19(3), 285-98 (2013)].

Figure 2. Integration of energy metabolism and cell death. [Taken from Antioxid Redox Signal.19(3), 285-98 (2013)].

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:*
Silvia Lázaro García
Beatriz Gozalbo López

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
David Gamarra Carrasco
Andrea Canto Méndez

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Susana Sánchez Lara

Estudiantes /
Undergraduate Students:

María Félix Bueno Galindo
Irene Huerga
Adrián Gabriel Zucco
Eva Martín del Pico
Daniel Meraviglia-Crivelli
Wael Obeid
Felicitas Hengel

Científicos visitantes /
Visiting Scientists:

Dr. Diego Miranda-Saavedra
Tihana Trsan

Resumen de investigación

Investigamos los mecanismos que subyacen a la respuesta inmune celular frente a infecciones virales, para contribuir al diseño racional de vacunas. Las infecciones muy citopáticas se controlan 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 inducir 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 infectadas, que permiten la activación inicial de dichos linfocitos. Estudiamos la proteólisis intracelular, como primer paso del procesamiento, y hemos identificado algunos de los mecanismos que median la inducción selectiva de estrés proteotóxico, así como de arresto de ciclo celular, en determinadas células tumorales por un inhibidor, AAF-cmk, de algunos miembros de la familia de las ubiquitin-hidrolasas. Analizamos además nuevas rutas de procesamiento antigénico que son independientes de los transportadores TAP. El conocimiento de estas vías podría explicar el eficaz control de muchas infecciones por personas deficientes en TAP, así como sugerir cómo tratar sus infecciones respiratorias recurrentes y severas.

En modelos animales de infección, describimos la señalización en linfocitos T por la protooncoproteína N-ras a través de PI3Kγ-AKT y eomesodermina. Esta vía es clave en inducir una respuesta inmune antiviral de linfocitos T CD8⁺ de memoria protectores, eficaces y duraderos, crítica para la vacunación.

Colaboramos con Manuel Ramos, Carolina Johnstone, José Antonio Melero, Daniel López y Cecilio López-Galíndez (Instituto de Salud Carlos III, Madrid), Edgar Fernández-Malavé (Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid), Eugenio Santos (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca), José Yélamos (Instituto Municipal de Investigaciones Médicas y Hospital del Mar, Barcelona) y Pedro Aparicio (Facultad de Medicina, Universidad de Murcia).

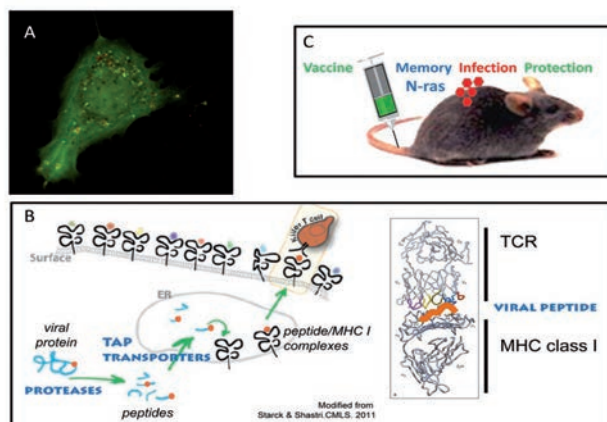


Figura 1. A. Formación defectuosa de autolisomas inducida por tratamiento con AAF-cmk. B. Mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos virales a linfocitos T citotóxicos CD8⁺. C. Papel de N-ras en la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ antivirales de memoria.

Figure 1. A. Defective autolysosome generation induced by treatment with AAF-cmk. B. Understanding the mechanisms of viral antigen processing and presentation to CD8⁺ T lymphocytes. C. Role of N-ras in antiviral memory CD8⁺ T-lymphocyte differentiation.

Research summary

Our interest is to study the mechanisms underlying the cellular immune response to viral infections, in order to gain knowledge useful for rational 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 virus-infected dendritic cells, which de novo prime these lymphocytes. As a first step in processing, we work on intracellular proteolysis. We have identified some of the mechanisms underlying the selective induction of proteotoxic stress, as well as cell cycle arrest, in certain tumor cells by an inhibitor, AAF-cmk, that targets members of the ubiquitin-hydrolase family. We also study novel routes of viral antigen presentation to CD8⁺ T lymphocytes, particularly those that are independent of TAP transporters. Detailed knowledge of these pathways may help explain why TAP-deficient humans control most pathogen infections, as well as help design ways to treat the recurring infections they suffer.

In animal models of infection, we have found that, in antiviral T lymphocytes, the protooncoprotein N-ras signals through PI3K γ -AKT and eomesodermin. This pathway contributes to an efficient, protective and long-lasting antiviral CD8⁺ T lymphocyte memory response, a basis of vaccines.

We have on-going collaborations with Manuel Ramos, Carolina Johnstone, José Antonio Melero, Daniel López and Cecilio López-Galíndez (Instituto de Salud Carlos III, Madrid), Edgar Fernández-Malavé (Faculty of Medicine, Universidad Complutense de Madrid), Eugenio Santos (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca), José Yélamos (Instituto Municipal de Investigaciones Médicas and Hospital del Mar, Barcelona) and Pedro Aparicio (Faculty of Medicine, Universidad de Murcia).

Publicaciones / Publications

Johnstone, C., Ramos, M., García Barreno, B., López, D., Melero J. A. and Del Val, M. (2013). Exogenous, TAP independent lysosomal presentation of a respiratory syncytial virus CTL epitope. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 978-982.

Del Val, M., Lázaro, S., Ramos M. and Antón, L. C. (2013). Are membrane proteins favored over cytosolic proteins in TAP-independent processing pathways? *Mol. Immunol.*, **55**, 117-119.

S. Iborra, M. Ramos, D. M. Arana, S. Lázaro, F. Aguilar, E. Santos, D. López, E. Fernández-Malavé, and M. Del Val. (2013). N-ras couples antigen receptor signaling to Eomesodermin and to functional CD8⁺ T-cell memory but not to effector differentiation. *J. Exp. Med.*, **210**, 1463-1479.

M. Pernas, C. Casado, V. Sandois, C. Arcones, C. Rodríguez, E. Ruiz-Mateos, E. Ramírez de Arellano, N. Rallón, M. Del Val, E. Grau, M. López-Vázquez, M. Leal, J. Del Romero, C. López Galíndez. (2013). Prevalence of HIV-1 dual infection in LTNP-Elite Controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, **64**, 225-231.

J. R. Regueiro, E. Palou, M. Del Val, M. Fernández-Arquero, M. L. Vargas Pérez, C. López-Larrea, L. M. Villar, J. A. Brieva, E. López-Granados, M. Muro Amador, O. de la Calle-Martín. (2013). Where is the Spanish Society for Immunology going? *Inmunología*, **32**, 35-39.

A. Barriga, E. Lorente, C. Johnstone, C. Mir, M. Del Val, and D. López. A common minimal motif for the ligands of HLA-B*27 class I molecules. (2014). *PLoS ONE* **9**(9):e106772.

Antón LC, Yewdell JW. Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors. *J Leukoc Biol.* (2014). **95**, 551-562.

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.
- Académica Correspondiente Electa de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Divulgación Científica: serie Ciencia con Chocolate y charlas individuales.
- Miembro del Comité Científico-Técnico del Biobanco Español de HIV.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Silvia Lázaro García (2013). Vías alternativas de presentación de antígenos del virus vaccinia por MHC de clase I. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Co-Directores: Margarita del Val Latorre y Salvador Iborra Martín.

Lorena López Ferreras (2013). Modulación de la proteostasis celular por el inhibidor Ala-Ala-Phe-clorometilcetona. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Co-Directores: Luis Antón Canto y Margarita del Val Latorre.

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:
Pilar López Nieva
Laura González Sánchez
María A. Cobos Fernández

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

José Luis Marín Rubio
Irene Vázquez Domínguez

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:
María del Carmen de Arriba Pérez
Isabel Sastre

Estudiantes / Undergraduate Students:
Celia Santos Tapias
Álvaro Peiró
Bárbara Briega
Lucía Bermejo Carrasco
Pablo Delgado Wicke

Resumen de investigación

Durante los dos últimos años nuestro equipo ha venido trabajando en la identificación de genes de susceptibilidad en cáncer, prestando especial atención a los linfomas linfoblásticos T (T-LBL). La integración de diferentes aproximaciones genómicas nos ha permitido identificar nuevas alteraciones genéticas en genes codificantes y no-codificantes (microRNAs) implicadas en el desarrollo de este tipo de linfomas. De modo específico, hemos demostrado que la desregulación de un pool específico de microRNAs, actuando a través del gen *Smoothened* (*Smo*), contribuye a la supervivencia de los linfoblastos T en subtipos tempranos de la enfermedad. El gen *Smo* es el único miembro no redundante de la vía de señalización Hh, y su sobre-expresión en los linfomas sugiere la conveniencia de utilizar inhibidores específicos de Smo en combinación con las terapias convencionales. Otro aspecto destacable ha sido la implicación de diferentes miembros de la vía apoptótica de señalización Fas/FasL en el desarrollo de los T-LBLs. Por otro lado, nuestro equipo ha colaborado con otros grupos en la evaluación de variantes raras de un nuevo gen de Anemia de Fanconi (ERCC4/FANCQ) como un posible gen de susceptibilidad en cáncer de mama/ovario, y en la demostración de que el receptor cannabinoide CB2 es un regulador fundamental de la vía oncogénica de HER2 en cáncer de mama. Finalmente, hemos identificado nuevos genes de susceptibilidad implicados en trastornos de alcoholismo y en la respuesta al tratamiento con risperidona. Como iniciativas futuras cabría señalar nuestro interés por (1) evaluar los efectos oncogénicos combinados de la desregulación de diferentes elementos de las vías de Notch y Jak/Stat; (2) integrar los datos sobre alteraciones genéticas y epigenéticas, y (3) explotar los efectos colaterales generados por las delecciones más comunes de los T-LBLs, para mejorar los protocolos de pronóstico y diagnóstico, y para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Research summary

In the last two years we have been working on cancer susceptibility, with particular reference to T-LBL lymphomas as a subtype of T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphomas. The integration of genomic approaches has enabled us to reveal a map of genetic alterations in coding and non-coding genes (microRNAs), which provided new insights about T-cell lymphoblastic lymphoma development. Specifically, we have demonstrated that down-regulation of a specific pool of miRNAs contributes to the survival of T-lymphoblasts in early T-cell lymphoblastic lymphoma by enhancing the expression of *Smoothed* (*Smo*), a key gene in the *Hh* signalling pathway, therefore suggesting the convenience of using *Smo* inhibitors in combination with standard therapeutic protocols. Another interesting work led us to unravel how the deregulation of *Fas/FasL* apoptotic signalling pathway is contributing to T-LBL development. In addition our team has collaborated with other groups in the assessment of rare variants in the new Fanconi Anaemia gene *ERCC4* (*FANCC*) as familial breast/ovarian cancer susceptibility, and in the demonstration that the cannabinoid receptor *CB2* is a pivotal regulator of *HER2* oncogenic signalling in breast cancer. Finally, we have identified new susceptibility genes involved in alcohol use disorders, and associated with the response to risperidone treatment of schizophrenic patients. Present and future initiatives of our group are to assess the oncogenic potential of deregulation of *Notch* and *Jak/Stat* pathways, to integrate genetic and epigenetic changes in T-LBL development, and to exploit the collateral damage of common deletions to kill lymphoma cells, in order to improve prognosis and diagnosis, and to design more effective therapies.

Publicaciones / Publications

Elena González-Gugel, María Villa-Morales, Javier Santos, María J. Bueno, Marcos Malumbres, Socorro María Rodríguez-Pinilla, Miguel Ángel Piris and José Fernández-Piqueras (2013) Down-regulation of specific miRNAs enhances the expression of the gene *Smoothed* and contributes to T-cell lymphoblastic lymphoma development. *Carcinogenesis* **34**, 902-908.

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. (2013) Association of common genetic variants with risperidone adverse events in a Spanish schizophrenic population. *Pharmacogenomics* **13**, 197-204.

Berta Almoguera, Rosa Riveiro-Alvarez, Jorge Lopez-Castroman, Pedro Dorado, Concepción Vaquero-Lorenzo, José Fernandez-Piqueras, Adrián Llerena, Francisco Abad-Santos, Enrique Baca-García, Rafael Dal-Ré, Carmen Ayuso Spanish Consortium of Pharmacogenetics Research in Schizophrenia. (2013) CYP2D6 poor metabolizer status might be associated with better response to risperidone treatment. *Pharmacogenetic Genomics* **23**, 627-630.

Osorio, A., Bogliolo, M., Fernández, V., Barroso, A., de la Hoya, M., Caldes, Adriana Lasa, T., Ramón y Caja, T., Santamariña, M., Vega, A., Quiles, F., Lázaro, C., Díez, O., Fernández, D., González-Sarmiento, R., Durán, M., Fernández Piqueras, J., Marín, M., Pujol, R., Surrallés, J., and Benítez, J. (2013) Evaluation of rare variants in the new Fanconi Anemia gene *ERCC4* (*FANCC*) as familial breast/ovarian cancer susceptibility alleles. *Human Mut* **34**, 1615-1618.

Villa-Morales, M; Cobos, MA; González-Gugel, E; Álvarez-Iglesias, V; Martínez, B; Piris, MA; Carracedo, A; Benítez, J. and Fernández-Piqueras, J. (2014) *FAS* system deregulation in T-cell lymphoblastic lymphoma. *Cell Death & Disease* **6**;e1110.

Vaquero-Lorenzo, C., Lopez-Castroman, J., Bermudo-Soriano, CR., Saiz-Ruiz, J., Fernandez-Piqueras, J., and Baca-Garcia, E. (2014) Putative association between the -1415 T/C polymorphism of Spermidine/spermine N1- acetyltransferase (*SSAT1*) gene and alcohol use disorders in women and men. *Am J Drug Alcohol Abuse*. **40**, 240-243.

Otras actividades / Other activities

Organizador y ponente del V y VI Cursos de Formación del Profesorado: El Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Consejería de Educación de la CAM/CBMSO-UAM. (años 2013 y 2014).

Coordinador del Área de Biomedicina de la ANEP.

Miembro del Comité de Ética de OPIS.

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 (CEE-CBMSO).

Miembro de la "Comisión para la valoración de la adecuación de la formación de los facultativos responsables de las unidades asistenciales de Genética" de Comunidad de Madrid.

Presidente del Comité Asesor de Expertos de la Fundación FARPE y FUNDALUCE.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Manuel Malavé Galiana (2014). Bases genéticas de la respuesta radioadaptativa en timocitos de ratón. Universidad Autónoma de Madrid (Facultad de Ciencias). Directores: José Fernández Piqueras, Javier Santos y Pablo Fernández Navarro.

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 (Hasta Dic 2013)
Pablo Gómez del Arco

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*

Konstantino Stamatakis
Alicia Arranz de Miguel
Ruth Álvarez Díaz

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:*

Cristina Poveda Cuevas
Alba Jiménez Segovia
Javier Galán Martínez
Marta Jiménez Martínez
Jesús Osuna Pérez
Sofía Cabarjosa González

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance:*

Beatriz Barrocal López
M^a Ángeles de Chorro y de Villa-Ceballos
M^a Carmen Maza Moreno
Carlos Chillón Marinas
Ana Flores Robles

Estudiantes /

Undergraduate Students:
Inés Sánchez

Marta Villa
Jesús Osuna
Lucía Barrado Gil

Científicos Visitantes /

Visiting Scientists:
Héctor Omar Rodríguez

Resumen de investigación

Estudiamos el efecto de los receptores Toll (TLR)/NFAT/ciclooxigenasa (COX)-2/prostaglandinas (PG) en inmunidad y patologías inflamatorias como la Obesidad, Cáncer y Sepsis. PGE₂ controla la migración y activación de linfocitos T, y la duración de su interacción con células presentadoras de antígeno. La migración de macrófagos por PGE₂ se debe a la activación de PI3K-P110gamma. PGF2 α inhibe la diferenciación de adipocitos a través del factor de transcripción NFAT. La deficiencia de NFATc4 induce obesidad en ratón indicando un papel clave en el control de la obesidad y el metabolismo de ácidos grasos.

Inhibidores de Cox2 reducen el cáncer colorrectal, pero tienen riesgos cardiovasculares. Como un enfoque terapéutico alternativo, hemos identificado genes regulados por Cox2 que proporcionan ventajas oncogénicas. Entre ellos, identificamos mPGES1, PMEPA1 y DUSP10 en cáncer de ovario o colon. mPGES1, se induce por PGF2 α /Egr-1 estando implicada en proliferación celular. DUSP10 controla la respuesta a estrés y confluencia, mientras PMEPA1 induce la transición epitelio-mesenquimal. DUSP10 inhibe la activación de la proteína quinasa p38 (MAPK), mientras que PMEPA1 inhibe la fosforilación de SMAD1,5,8 por TGF β .

Diferentes linajes genéticos existen en *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, su biología comparada y patogenia es fragmentaria. Hemos identificado diferentes respuestas inmunes T dependientes, tanto en pacientes como modelo de ratón que difieren en función de la cepa infectante. Además, estamos estudiando cómo entra el parásito y escapa la destrucción por las células mieloides, definiendo Slamf1 como un nuevo receptor de *T. cruzi*. En contraste, encontramos que Slamf8 es un receptor de superficie celular que se expresa tras la activación de los macrófagos por IFN- γ y juega un papel negativo en la infección a través de la represión de la NADPH-oxidasa. Todo con la intención de mejorar la comprensión y prevención de la Enfermedad de Chagas.

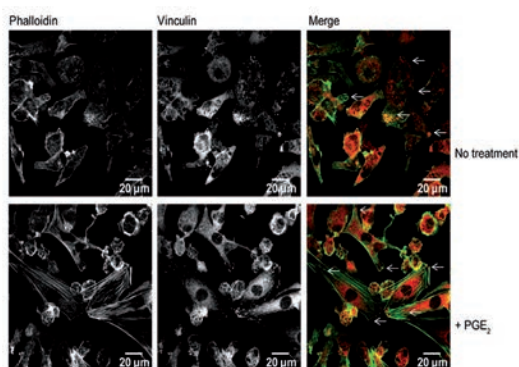


Figura 1. PGE₂ promueve la adhesión de macrófagos. Análisis por microscopía confocal de podosomas y contactos focales tras tratamiento con PGE₂. PGE₂ (2 μ M) se añadió antes de activar la adhesión celular de los macrófagos peritoneales con fibronectina durante 18 horas. PGE₂ disminuye el número de células con podosomas y aumenta la formación de contactos focales. Flechas indican podosomas o contactos focales (verde = phalloidin, Rojo = vinculina).

Figure 1. PGE₂ promotes macrophage adhesion. Analysis of podosomes and focal adhesion formation after treatment with PGE₂ by confocal microscopy. PGE₂ (2 μ M) was added before triggering cell adhesion of peritoneal macrophages to fibronectin during 18 hours. PGE₂ decreases the number of cells with podosomes. PGE₂ increases focal adhesion formation. Arrows points to podosomes or focal adhesions (Green=Phalloidin, Red=vinculin).

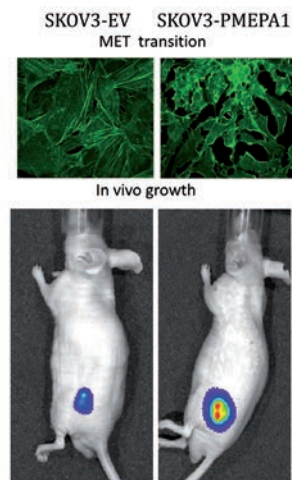


Figura 2. PGE₂, PMEPA1 induce la transición epitelio mesénquima e incrementa la proliferación tumoral in vivo.

Figure 2. PMEPA1 induces epithelial-mesenchymal-transition and increases in vivo tumor proliferation in nude mice.

Research summary

We are analysing the involvement of Toll-like receptors (TLR)/NFAT/Cyclooxygenase (Cox)-2/prostaglandins (PGs) in the immune system and inflammatory pathologies as Obesity, Cancer and Sepsis. PGE₂ trigger activation and migration of T lymphocytes, controlling the duration of their interaction with antigen presenting cells. Macrophage migration is induced by PGE₂ due to activation of p110g-PI3K by PG receptors. PGF2 α negatively regulates adipocyte differentiation through the transcription factor NFAT. Moreover, NFATc4 deficiency induces obesity in mice indicating a key role in obesity and fatty acid metabolism.

Cox2 Inhibitors reduce colorectal cancer but have cardiovascular risks. As an alternative therapeutic approach, we have analysed genes regulated by Cox2 and select those that could provide a protooncogenic advantage to form tumours and/or metastasize. Among those, we identified, mPGES1, PMEPA1 and DUSP10 as Cox2 induced molecules in ovarian or colon cancer. mPGES1 is involved in increased growth and induced through a PGF2 α /Egr-1 mechanism. DUSP10 controls stress response to serum deprivation and confluence arrest whereas PMEPA1 induces Epithelial Mesenchymal Transition. DUSP10 inhibits p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) activation, whereas PMEPA1 inhibit phosphorylation of SMAD1,5,8 by TGF β .

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. We have identified different T dependent immune responses both in patients and mouse model that differ depending of the infecting strain. Besides, we are studying how the parasite enters, infects and escapes destruction by myeloid cells, defining Slamf1 (CD150) as a new *T. cruzi* receptor. In contrast, we found that Slamf8 (CD353) is a cell surface receptor that is expressed upon activation of macrophages by IFN- γ and play a negative role in the infection through repression of the NADPH oxidase. All intended for improved understanding and prevention of Chagas' disease.

Publicaciones / Publications

Corral, R. S., N. A. Guerrero, H. Cuervo, N. Girones, and M. Fresno (2013) *Trypanosoma cruzi* Infection and Endothelin-1 Cooperatively Activate Pathogenic Inflammatory Pathways in Cardiomyocytes. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2034.

Diaz-Munoz, M. D., I. C. Osma-Garcia, M. A. Iniguez, and M. Fresno (2013) Cyclooxygenase-2 deficiency in macrophages leads to defective p110gamma PI3K signaling and impairs cell adhesion and migration. *J Immunol* 191: 395-406.

Gutierrez-Erlandsson, S., P. Herrero-Vidal, M. Fernandez-Alfara, S. Hernandez-Garcia, S. Gonzalo-Flores, A. Mudarra-Rubio, M. Fresno, and B. Cubelos (2013) R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system. *Mol Cancer* 12: 127.

Iñiguez, M. A., C. Punzon, R. Nieto, J. Burgueno, J. M. Vela, and M. Fresno. (2013) Inhibitory effects of sigma-2 receptor agonists on T lymphocyte activation. *Front Pharmacol* 4: 23.

Sanoja, C., S. Carbajosa, M. Fresno, and N. Girones (2013) Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One* 8: e65820.

Tamargo, B., Y. Marquez, W. Ramirez, B. Cedre, M. Fresno, and G. Sierra (2013) New proteoliposome vaccine formulation from *N. meningitidis* serogroup B, without aluminum hydroxide, retains its antineurococcocal protectogenic potential as well as Th-1 adjuvant capacity. *BMC Immunol* 14 Suppl 1: S12.

De Winne, K., P. Buscher, A. O. Luquetti, S. B. Tavares, R. A. Oliveira, A. Solari, I. Zulantay, W. Apt, P. Diosque, M. Monje Rumi, N. Girones, M. Fresno, R. Lopez-Velez, J. A. Perez-Molina, B. Monge-Maillo, L. Garcia, and S. Deborggraeve (2014) The *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA OligoC-TesT and *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA OligoC-TesT for Diagnosis of Chagas Disease: A Multi-cohort Comparative Evaluation Study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 January; 8(1): e2633.

Perez-Molina, J. A., C. Poveda, A. Martinez-Perez, F. Guhl, B. Monge-Maillo, M. Fresno, R. Lopez-Velez, J. D. Ramirez, and N. Girones (2014) Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. *Infect Genet Evol* 21: 440-442.

Poveda, C., M. Fresno, N. Girones, O. A. Martins-Filho, J. D. Ramirez, J. Santi-Rocca, J. A. Marin-Neto, C. A. Morillo, F. Rosas, and F. Guhl (2014) Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). *PLoS One*. 2014; 9(3): e91154. Published online 2014 March 7.

Sandoval, P., J. A. Jimenez-Heffernan, A. Rynne-Vidal, M. L. Perez-Lozano, A. Gilsanz, V. Ruiz-Carpio, R. Reyes, J. Garcia-Bordas, K. Stamatakis, J. Dotor, P. L. Majano, M. Fresno, C. Cabanas, and M. Lopez-Cabrera (2014) Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *J Pathol* 231: 517-531.

Rodriguez HO, Guerrero NA, Fortes A, Santi-Rocca J, Gironès N, Fresno M. (2014) *Trypanosoma cruzi* strains cause different myocarditis patterns in infected mice. *Acta Trop*. 11;139C:57-66.

Bonner M, Amard V, Bar-Pinatel C, Charpentier F, Chatard JM, Desmuyck Y, Ihler S, Rochet JP, Roux de La Tribouille V, Saladin L, Verdy M, Gironès N, Fresno M, Santi-Rocca J. (2014) Detection of the amoeba *Entamoeba gingivalis* in periodontal pockets. *Parasite*. 2014; 21: 30.

Gironès N, Carbajosa S, Guerrero NA, Poveda C, Chillón-Marinas C, Fresno M (2014) Global Metabolomic Profiling of Acute Myocarditis Caused by *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. Nov 20; 8(11): e3337.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Nestor A. Guerrero Gutiérrez (2013). Role of arachidonic acid metabolites in *Trypanosoma cruzi* infection. Universidad Autónoma de Madrid. Mención Doctorado Europea. Manuel Fresno & Nuria Girones.

Gema Marín Alberca (2013). Regulación de la expresión de ciclooxigenasa-2 por calcio en macrófagos y análisis de su papel en el desarrollo de aterosclerosis. Universidad Autónoma de Madrid. Manuel Fresno & Miguel Ángel Iñiguez Peña.

Sofía Carbajosa González (2014). Alteraciones en la hematopoyesis y el metabolismo de la L-arginina durante la infección aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*. Universidad Autónoma de Madrid. Mención Doctorado Internacional. Manuel Fresno & Nuria Girones.

Acciones de los prostanoïdes en procesos inflamatorios

Prostanoids actions in inflammatory processes

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

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

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Ana Renshaw Calderón

Estudiantes /
Undergraduate Students:
María Velasco de Andrés
Silvia Rodríguez Rozada

Resumen de investigación

Existen múltiples evidencias sobre las acciones de mediadores lipídicos como los prostanoïdes o compuestos oxidados derivados del colesterol en la modulación del proceso inflamatorio asociado a múltiples patologías, como la artritis, la aterosclerosis y el cáncer. La familia de los prostanoïdes incluye a las prostaglandinas (PGs) y a los tromboxanos (TXs), derivados del ácido araquidónico tras la acción de ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y distintas PG sintasas. Por otro lado, los receptores LXR (Liver X receptor) y sus ligandos, entre los que se encuentran los oxisteroles, juegan un papel esencial en la regulación del transporte de colesterol, a la vez que poseen propiedades anti-inflamatorias a través de la regulación de la expresión de genes esenciales en la activación de células del sistema inmune como los macrófagos y los linfocitos T.

Los principales objetivos de nuestra línea de investigación incluyen el estudio de los mecanismos moleculares a través de los cuales los prostanoïdes y los ligandos de LXR ejercen sus acciones en la respuesta inmune y su contribución en patologías que cursan con procesos inflamatorios, mediante el uso de modelos celulares y animales. Estos estudios incluyen el análisis de los efectos de los prostanoïdes y de ligandos de los receptores LXRs y de su interrelación, a través de sus acciones sobre la señalización celular, la activación transcripcional y la expresión génica, en diversos tipos celulares como linfocitos T y macrófagos. La investigación sobre el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las acciones de los prostanoïdes y de los ligandos de LXRs en la inflamación y en la respuesta inmune, tiene especial relevancia, dado el creciente interés acerca de la influencia de los procesos inflamatorios en múltiples patologías, así como sobre las posibilidades de intervención terapéutica a través de la modulación de las acciones de estos agentes.

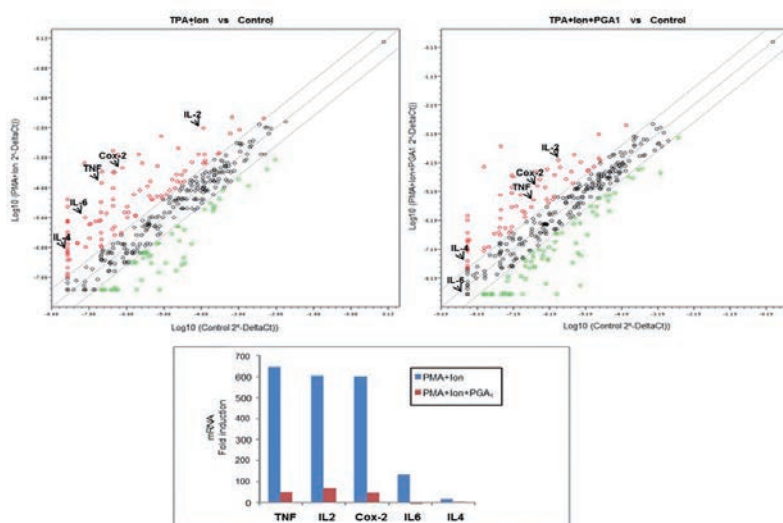


Figura 1. Análisis del efecto de PGs ciclopentenonas sobre la expresión génica en linfocitos T activados. Las células Jurkat se trataron con PGA1 y se estimularon con PMA+ionóforo de calcio (15 ng/ml + 1 μ M) durante 18 horas. La expresión de un panel de 96 genes se determinó mediante un array de qPCR (Human Immunology 384 StellARay™). La gráfica inferior muestra el efecto de la PGA1 sobre los niveles de inducción de los mRNAs de ciertos genes seleccionados (TNF, IL2, IL4, IL6 y COX-2).

Figure 1. Analysis of the effect of PGs cyclopentenones on gene expression in activated Jurkat T lymphocytes. Cells were treated with PGA1 and stimulated with PMA + calcium ionophore (15 ng / ml + 1 μ M) for 18 hours. The expression of a panel of 96 genes was determined by qPCR array (Human Immunology StellARay™ 384). The bottom graph shows the effect of PGA1 on the level of mRNA induction of selected genes (TNF, IL2, IL4, IL6 and COX-2).

Research summary

Lipid mediators such as prostanoids or oxidized compounds derived from cholesterol play an essential role in the modulation of the inflammatory process associated with multiple diseases as arthritis, atherosclerosis and cancer. Prostanoid family include prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs), synthesized from arachidonic acid by the action of cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) and various PG synthases. On the other hand, LXRs (Liver X receptors) and their ligands, including oxidized cholesterol compounds, are key agents in the regulation of cholesterol transport and lipid metabolism, while having anti-inflammatory properties through the regulation of the expression of essential genes in the activation of immune cells such as macrophages and T lymphocytes.

The main objectives of our research include the study of the molecular mechanisms by which prostanoids and LXR ligands exert their actions on the immune response and their involvement in pathologies with inflammatory processes, using cellular and animal models. These studies include the analysis of the effects of prostanoids and LXR ligands, and their interrelationship, through their actions on cell signaling, and transcriptional activation of gene expression in various cell types including T lymphocytes and macrophages. Advances in the knowledge of the molecular and cellular basis of the actions of prostanoids and LXR ligands in inflammation and in the immune response, is especially relevant, given the growing interest on the influence of inflammatory processes in multiple pathologies and on the possibilities for therapeutic intervention by modulating the actions of these agents.

Publicaciones / Publications

Díaz-Muñoz, M., Osma-García I.C., Íñiguez, M.A. and Fresno, M. (2013). Cyclooxygenase-2 deficiency in macrophages leads to defective p110gamma PI3K signalling and impairs cell adhesion and migration. *J. Immunol* **19**, 395-406.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Elena Hernández Subirá (2014). Regulación de la expresión génica por la prostaglandina F2α en linfocitos T y cardiomiocitos: activación de la vía de señalización de calcio/calcineurina/NFAT. Universidad Autónoma de Madrid. Director de Tesis: Miguel A. Íñiguez.

Paloma Guillem Llobat (2013). Efectos de los ligandos de receptores LXR sobre la activación de macrófagos y el desarrollo de aneurismas aórticos abdominales. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Miguel A. Íñiguez

Gema Marín Alberca (2013). Regulación de la expresión de la ciclooxigenasa-2 por calcio en macrófagos y análisis de su papel en el desarrollo de aterosclerosis. Universidad Autónoma de Madrid. Directores de Tesis: Miguel A. Íñiguez y Manuel Fresno Escudero.

Bases moleculares y celulares de la fisiopatología asociada a la expresión de antígenos intracelulares

Molecular and cellular basis of the physio(patho)logy associated with the expresión of intracellular antigens



Jefe de Línea / Group Leader:
José María Izquierdo Juárez

Personal Científico /
Scientific Staff:
José Manuel Sierra Pérez

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Carmen Sánchez Jiménez

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
José Alcalde García

Resumen de investigación

La regulación de la heterogeneidad del transcriptoma y del proteoma representa una etapa clave para comprender las diferencias en la diversidad entre organismos de complejidades genéticas semejantes. Los antígenos intracelulares TIA1 (*T-cell intracellular antigen 1*) y TIAR/TIAL1 (*TIA1 related/like protein*) se han implicado en la regulación y/o modulación de la expresión genética sobre diferentes aspectos del metabolismo del RNA, como son: 1) la transcripción, a través de su interacción con el DNA y la RNA polimerasa II; 2) el procesamiento alternativo del pre-mRNA, a través de la selección de sitios 5' de corte y empalme atípicos; 3) la localización, estabilidad y/o traducción de los mRNAs eucarióticos, a través de la interacción con las regiones 5' y 3' no traducibles y 4) el control de programas biológicos fundamentales para la viabilidad celular (inflamación, proliferación, apoptosis, estrés o infecciones por virus). En consecuencia, la hipótesis de partida de nuestra línea de investigación -como continuación de los estudios iniciados por nuestro grupo hace nueve años- es que estas proteínas desempeñan un papel relevante en el control de la expresión genética adaptando el transcriptoma y el proteoma humano, su expresión y su función, con el fin de sobrevivir a situaciones aberrantes que comprometan la homeostasis celular en condiciones fisiopatológicas como el estrés celular, la tumorigénesis o el envejecimiento y sus patologías asociadas. Nuestro objetivo fundamental es, por consiguiente, comprender los procesos celulares y los mecanismos moleculares tempranos y tardíos en los que las proteínas TIA participan y cómo contribuyen a regular y/o modular la homeostasis celular, evitando el desarrollo y/o progresión de fenotipos deletéreos. El conocimiento de las dinámicas reguladoras asociadas a estos antígenos intracelulares servirá de base para la identificación de futuras dianas terapéuticas.

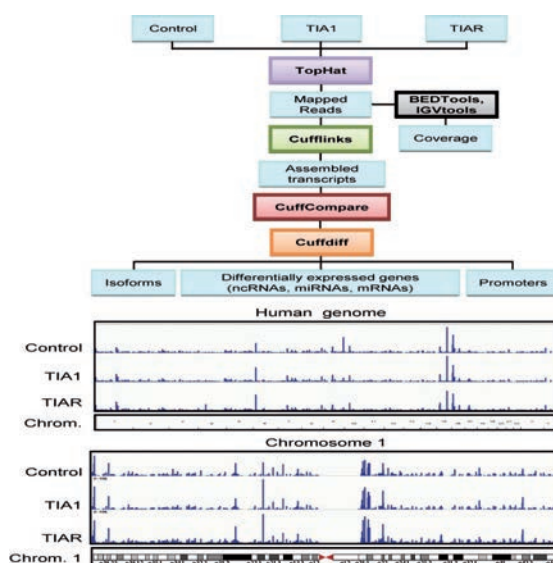


Figura 1. Caracterización por secuenciación masiva de los transcriptomas poli(A⁺) asociados a células HeLa con expresión disminuida de los antígenos TIA1 o TIAR.

Figure 1. Characterization by massive poly(A⁺) sequencing of the transcriptomes associated with TIA1 or TIAR-knocked down HeLa cells.

Research summary

The regulation of the heterogeneity of the transcriptome and proteome is key stage on the way to understand differences in the diversity of proteins observed in organisms of similar genetic complexity. The intracellular antigens TIA1 (T-cell intracellular antigen 1) and TIAR/TIAL1 (TIA1 related/like protein) have been involved in the regulation of gene expression on different aspects of the control of RNA metabolism, such as: i) transcription through its interaction with DNA and RNA polymerase II; ii) alternative splicing of pre-mRNA through the selection of atypical 5' splicing sites; iii) localization, stability and/or translation of eukaryotic mRNAs through the interaction with 5' and 3' untranslated regions; and iv) modulation of biological programmes for cell survival (inflammation, proliferation, apoptosis, cell stress or infections by viruses). As a consequence, the initial hypothesis -of the work line initiated nine years ago- it is that these proteins may play a fundamental role in controlling gene expression by regulating/modulating the dynamics of human transcriptome and proteome, their expression and function, in order to prevent situations which put aberrant cell viability at risk in patho-physiological situations such as stress-associated responses, tumorigenesis or aging and their related diseases. So today, our objective is to characterize the early and late cellular processes and molecular mechanisms in which TIA proteins participate and how they are involved to regulate/modulate cellular homeostasis via preventing the development and/or progression of deleterious phenotypes. Understanding the regulatory dynamics associated with these intracellular antigens could serve as the basis for identifying future therapeutic targets.

Publicaciones / Publications

Sánchez-Jiménez, C., Carrascoso, I., Barrero, J. and Izquierdo, J. M. (2013) Identification of a set of miRNAs differentially expressed in transiently TIA-depleted HeLa cells by genome-wide profiling. *BMC Mol. Biol.* **14**, 4.

Álvarez, E., Castelló, A., Carrasco, L. and Izquierdo, J. M. (2013) Poliovirus 2A protease triggers a selective nucleo-cytoplasmic redistribution of splicing factors to regulate alternative pre-mRNA splicing. *PLoS One* **8**, e73723.

Sánchez-Jiménez, C. and Izquierdo J. M. (2013) T-cell intracellular antigen (TIA)-proteins deficiency in murine embryonic fibroblasts alters cell cycle progression and induces autophagy. *PLoS One* **8**, e75127.

Carrascoso, I., Sánchez-Jiménez, C. and Izquierdo, J. M. (2014) Genome-wide profiling reveals a role for T-cell intracellular antigens TIA1 and TIAR in the control of translational specificity in HeLa cells. *Biochem. J.* **461**, 43-50.

Carrascoso, I., Sánchez-Jiménez, C. and Izquierdo, J. M. (2014) Long-term reduction of T-cell intracellular antigens leads to increased beta-actin expression. *Mol. Cancer* **13**, 90.

Núñez, M., Sánchez-Jiménez, C., Alcalde, J. and Izquierdo, J. M. (2014) Long-term reduction of T-cell intracellular antigens reveals a transcriptome associated with extracellular matrix and cell adhesion components. *PLoS One* **9**, e113141.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Carmen Sánchez-Jiménez (2014). Caracterización de modelos celulares con pérdida y ganancia de función de las proteínas TIA1 y TIAR. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José María Izquierdo Juárez.

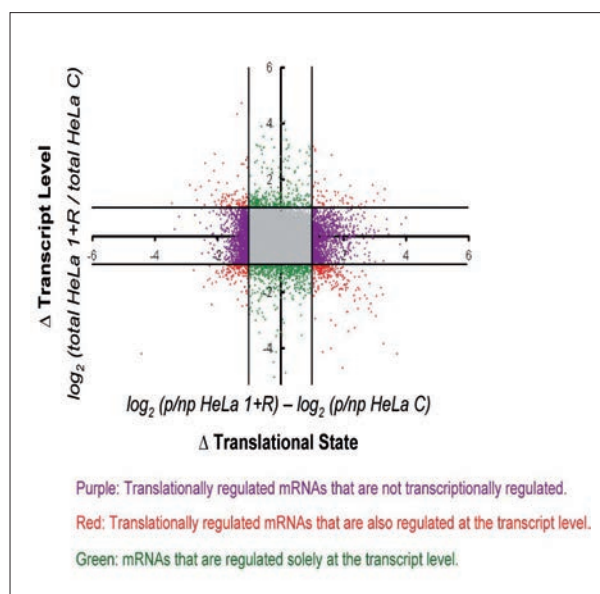


Figura 2. Análisis polisomales a gran escala muestran cambios en los niveles estacionarios y en las eficiencias de traducción de los mRNAs en células HeLa con expresión reducida de las proteínas TIA.

Figure 2. Polysome profiling analysis show global changes at the transcript and translation levels under TIA reduction in HeLa cells.

Fisiopatología Molecular de la Fibrosis

Molecular Pathophysiology of Fibrosis



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

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Fernando Rodríguez Pascual (Hasta 31/12/2013)

Postdoctorales/ *Postdoctoral Fellows:*
Marta Fierro Fernández
Francisco Javier Sanchez Gómez
(Hasta 31/12/2013)

Patricia Santos Valle
(Desde 1/1/2013 hasta 30/06/2013)
José González Santamaría
(Hasta 31/12/2013)
Rosa M. Bretón Romero
(Desde 1/7/2013 hasta 31/12/2013)
M. Ángeles Higuera
(Desde 1/6/2014)

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:*
Rosa M. Bretón Romero
(Hasta 30/6/2013)
Óscar Busnadiego Prieto
(Hasta 31/12/2013)

M. Cristina Espinosa Díez
M^a Ángeles Higuera López
(Hasta 31/5/2014)
Verónica Miguel Herranz
M. Estrella Soria López

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Eva M. Blanco Ruiz

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Patricia Sánchez
(Proyecto fin de grado)
María Victoria Aparicio Chacón
(Proyecto fin de grado)
Antonio Queiro
(Prácticas Extracurriculares)

Científicos visitantes /
Visiting Scientists:
Elena Sandoval Pinto
Matilde Alique Aguilar

Resumen de investigación

Nuestro laboratorio está interesado en los mecanismos moleculares que subyacen al proceso de fibrogénesis en patología humana. La fibrosis es la vía final común de muchas enfermedades orgánicas como la nefropatía diabética, la cirrosis hepática, la esclerodermia, la esclerosis miocárdica y la fibrosis pulmonar idiopática o mediada por inflamación. Tras una etapa prolongada dedicada al estudio de la pared vascular y la biología redox, hemos centrado nuestros esfuerzos en comprender como se desarrolla la fibrosis con un énfasis específico en el papel de los microRNAs y su regulación por señales redox en procesos como la transición epitelio-mesénquima, la señalización por TGF- β y la transformación de fibroblastos en miofibroblastos. Utilizamos modelos celulares y animales de fibrosis pulmonar, dérmica y renal. Nos proponemos descifrar no sólo el conjunto de microRNAs implicados en la fibrogénesis sino también los cambios metabólicos celulares asociados, promotores a su vez de respuestas redox específicas que activan la expresión de microRNAs relevantes en fibrogénesis.

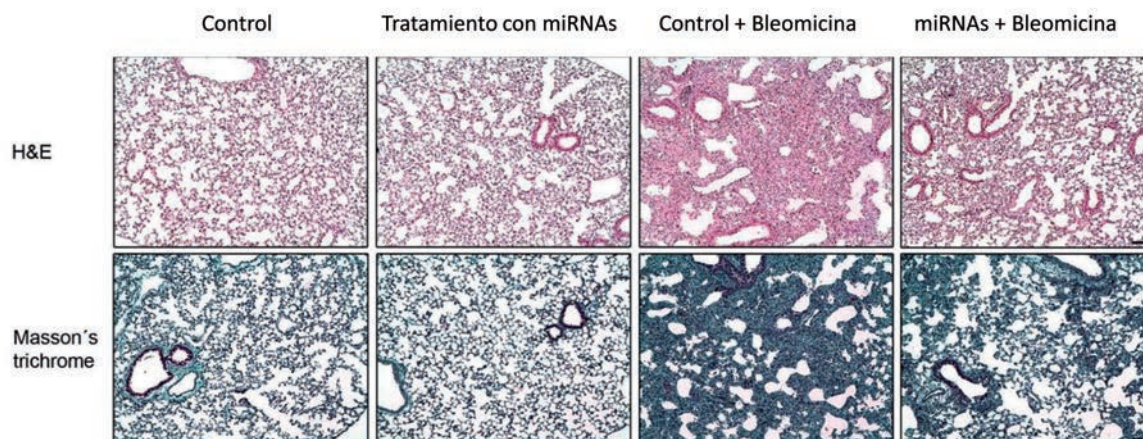


Figura 1. Microfotografías correspondientes al análisis histológico mediante tinciones de Hematoxilina y Eosina (paneles superiores) y Tricómico de Masson (paneles inferiores) de pulmones de ratones tratados con bleomicina o suero salino durante 14 días, con el fin de inducir fibrosis pulmonar, en ausencia o presencia de un microRNA.

Figure 1. Microphotographs of Hematoxylin and Eosin (upper panels) and Masson's Trichrome staining (lower panels) from lung sections of mice administered a microRNA followed by orotracheal bleomycin administration or saline for 14 days.

Research summary

Our laboratory is interested in the molecular mechanisms leading to fibrogenesis in human pathology. Fibrosis is the final common pathway for many organ diseases including diabetic kidney disease, liver cirrhosis, scleroderma, myocardial sclerosis and idiopathic or inflammatory-mediated pulmonary fibrosis. Evolving from a long-standing interest in the vascular wall and redox biology we have now focused our efforts on understanding how the process of fibrogenesis takes place with an emphasis on the role of microRNAs and their regulation by redox signals in processes such as epithelial to mesenchymal transition, TGF- β signaling and fibroblast to myofibroblast transformation. We employ cellular and animal models for lung, skin and kidney fibrosis. We plan to decipher not only the profile of microRNAs involved in fibrogenesis but also the link between the underlying metabolic cellular changes occurring in the fibrotic process and the triggering of specific redox responses leading to the expression of microRNAs relevant for fibrogenesis.

Publicaciones / Publications

Espinosa-Diez, C., Fierro-Fernández, M., Sánchez-Gómez, F., Rodríguez-Pascual, F., Alique, M., Ruiz-Ortega, M., Beraza, N., Martínez-Chantar, M.L., Fernández-Hernando, C., Lamas, S. Targeting of Gamma-Glutamyl-Cysteine Ligase by miR-433 Reduces Glutathione Biosynthesis and Promotes TGF- β -Dependent Fibrogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2014

Bretón-Romero, R., Acín-Perez, R., Rodríguez-Pascual, F., Martínez-Molledo, M., Brandes, R.P., Rial, E., Enríquez, J.A., Lamas, S. (2014) Laminar shear stress regulates mitochondrial dynamics, bioenergetics responses and PRX3 activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. **1843**(11):2403-13.

Busnadiego, O., Loureiro-Álvarez, J., Sandoval, P., Lagares, D., Dotor, J., Pérez-Lozano, M.L., López-Armada, M.J., Lamas, S., López-Cabrera, M., Rodríguez-Pascual, F. (2014) A pathogenetic role for endothelin-1 in peritoneal dialysis-associated fibrosis. *J Am Soc Nephrol*.; **26**(1):173-82.

Darley-Usmar, V., Grune, T., Lamas, S., Aw, T.Y. (2014) Redox Biology celebrates its first anniversary with over 100 articles, Listing In PubMed and 120,000 downloads with over 230 citations! *Redox Biol*. **2**:640-1.

Hernansanz-Agustín, P., Izquierdo-Álvarez, A., Sánchez-Gómez, F.J., Ramos, E., Villa-Piña, T., Lamas, S., Bogdanova, A., Martínez-Ruiz, A. (2014) Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radic Biol Med*. **71**:146-56.

Bretón-Romero, R., Lamas, S. (2014) Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol*. **2**:529-34.

Grune, T., Darley-Usmar, V., Aw, T.Y., Lamas, S. (2013) Off to a good start and a promising future in communicating cutting edge developments in redox biology. *Redox Biol*. **1**:446-7.

Grune, T., Darley-Usmar, V., Yee Aw, T., Lamas, S. (2013) Launch of Redox Biology: A new venue for studies in translational, basic and applied research in the fields of antioxidants, cell signaling and redox therapeutics. *Redox Biol*. **1**:17-8.

Sánchez-Gómez, F.J., Espinosa-Diez, C., Dubey, M., Dikshit, M., Lamas, S. (2013) S-glutathionylation: relevance in diabetes and potential role as a biomarker. *Biol Chem*. **394**(10):1263-80.

Bretón-Romero, R., Kalwa, H., Lamas, S., Michel, T. (2013) Role of PTEN in modulation of ADP-dependent signaling pathways in vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. **1833**(12):2586-95.

Bretón-Romero, R., Lamas, S. (2013) Hydrogen peroxide signaling mediator in the activation of p38 MAPK in vascular endothelial cells. *Methods Enzymol*. **528**:49-59.

Olmos, Y., Sánchez-Gómez, F.J., Wild, B., García-Quintans, N., Cabezudo, S., Lamas, S., Monsalve, M. (2013) SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex. *Antioxid Redox Signal*. **19**(13):1507-21.

Lenna, S., Chrobak, I., Farina, G.A., Rodríguez-Pascual, F., Lamas, S., Lafyatis, R., Scorza, R., Trojanowska, M. (2013) HLA-B35 and dsRNA induce endothelin-1 via activation of ATF4 in human microvascular endothelial cells. *PLoS One*. 2013;**8**(2):e56123.

Glineur, C., Gross, B., Neve, B., Rommens, C., Chew, G.T., Martin-Nizard, F., Rodríguez-Pascual, F., Lamas, S., Watts, G.F., Staels, B., (2013) Fenofibrate inhibits endothelin-1 expression by peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent and independent mechanisms in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **33**(3):621-8.

Martínez-Ruiz, A., Araújo, I.M., Izquierdo-Álvarez, A., Hernansanz-Agustín, P., Lamas, S., Serrador, J.M. (2013) Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling? *Antioxid Redox Signal*. **19**(11):1220-35.

Lamas, S., Ayuso, C. (2013) La integridad científica como fundamento esencial de la investigación clínica. In: *Luces y sombras en la investigación médica*. Editorial Triacastela. Directores Rafael Dal-Ré, Xavier Carné, Diego Gracia, pp 23-38.

Rodríguez-Pascual, F., Caramelo Díaz, C., Lamas, S. (2013) In: *Fisiopatología de la Pared Vascular Sección VI. Enfermedad Renal Vascular. Nefrología Clínica 4ª Edición*. Editorial Médica Panamericana, pp 255-258.

Otras actividades / Other activities

Organización de las Jornadas de Investigación "Una mañana en torno a los miRNAs" Mayo 2014. Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"

Tesis doctorales / Doctoral theses

M. Ángeles Higuera López (2014). Fisiología y Fisiopatología de DLK-1 en el Endotelio Vascular. Universidad Complutense de Madrid. Directores: Santiago Lamas y Patricia Rodríguez.

Rosa Bretón Romero (2013). Redox Signaling Responses to Laminar Shear Stress in vascular endothelial cells. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Santiago Lamas.

Grupo de Fisiopatología Molecular de la Inflamación y Fibrosis Peritoneal (PERINFIB)

Group for the Study of Peritoneal Inflammation and Fibrosis Molecular Pathophysiology



Jefe de Línea / Group Leader:
Manuel López Cabrera

Postdoctoral / Postdoctoral Fellow:
Pilar Sandoval Correa

(Contrato Proyecto P2010/BMD-232)

Guadalupe González Mateo
(Contrato Proyecto SAF2013-47611R)

Abelardo Aguilera Pralta
(Investigador Miguel Servet)

Jesús Loureiro Álvarez
(Contrato Proyecto SAF2010-21249)

Ignacio Benedicto Español
(Contrato proyecto CIBERehd)

Becarios Predoctorales / Graduate Students:

M^a Luisa Pérez Lozano
(Contrato Fundación Severo Ochoa)

Ángela Rynne Vidal
(Beca FPI cargo proyecto SAF2010-21249)

Georgios Liappas
(Contrato proyecto Marie Curie ITN, Grant: 287813)

Técnico de Investigación / Technical Assistance:
Patricia Albar Vicaíno
(Contrato Fundación Severo Ochoa)

Estudiantes / Undergraduate Students:
Adrián Acuña Ruiz
(Proyecto Fin de Máster)
Diego González Romero
(Proyecto Fin de Grado)

Científicos visitantes / Visiting Scientists:
Rebecca Herzog
Medical University of Vienna, ERA-EDTA
(Octubre 2014-Enero 2015)

Resumen de investigación

La Diálisis Peritoneal (DP) se emplea para el tratamiento de la enfermedad renal crónica avanzada, y se basa en la utilización del peritoneo como una membrana semipermeable a través de la cual se llevan a cabo los procesos de difusión y ultrafiltración. Durante la DP, el peritoneo se halla expuesto a soluciones bioincompatibles que causan inflamación, angiogénesis y fibrosis, dando lugar al fallo de membrana. Nuestro grupo ha demostrado que las células mesoteliales sufren una transición epitelio-mesénquimal (TEM) en respuesta a estas agresiones del peritoneo. En los últimos años, numerosos trabajos han demostrado que la TEM mesotelial es un buen marcador del fallo de membrana y una diana terapéutica para prevenir la fibrosis y/o angiogénesis inducidas por la DP.

Recientemente, nos planteamos si la TEM juega un papel en otras patologías peritoneales tales como la metástasis peritoneal y las adherencias post-quirúrgicas. La metástasis peritoneal es una complicación de los carcinomas abdominales, como el carcinoma de ovario, para la cual aún no existe ninguna terapia efectiva. La progresión de los implantes metastásicos peritoneales está influenciada por los Fibroblastos Asociados a los Carcinomas (CAFs por sus siglas en inglés), los cuales pueden derivar de diferentes tipos celulares. Nosotros hemos demostrado en biopsias humanas que una sub-población de CAFs deriva de las células mesoteliales a través de un proceso de TEM. Así mismo, nuestros resultados sugieren que la TEM hace más receptivo al peritoneo para la implantación de las células tumorales. Las adherencias post-quirúrgicas consisten en áreas de tejido fibrótico que unen entre si tejidos y órganos, normalmente no unidos, lo cual puede comprometer seriamente la vida del paciente. En la actualidad, se desconocen los procesos fisiopatológicos implicados en la formación de adherencias o bridas. El análisis histológico de bridas humanas ha demostrado que las células mesoteliales adyacentes al tejido fibrótico muestran signos de TEM, lo que sugiere que este puede ser el proceso inicial en la formación de bridas.

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 y 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.

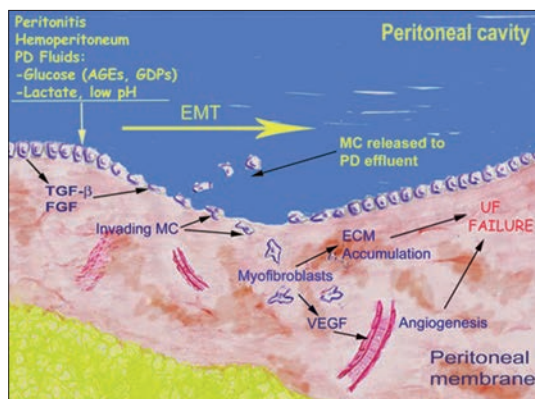


Figura 1. En el peritoneo se generan nuevas células fibroblásticas a través de la conversión local de las células mesoteliales (MCs), por transición epitelio mesénquima (TEM), durante la diálisis peritoneal. Las MCs transdiferenciadas invaden el estroma submesotelial y allí participan en los procesos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

Research summary

Used to treat advanced chronic kidney disease, peritoneal dialysis (PD) consists of using the peritoneum as a semipermeable membrane across which diffusion and ultrafiltration take place. During PD, the peritoneum is exposed to bio-incompatible solutions that cause inflammation, angiogenesis and fibrosis, resulting in membrane failure. Our group has shown that mesothelial cells undergo an epithelial-mesenchymal transition (EMT) in response to the peritoneal insult. During the last few years, there have been reports in the literature that mesothelial EMT is a good marker for membrane failure and a therapeutic target for preventing PD-induced fibrosis and/or angiogenesis.

Recently, we considered whether the EMT plays a role in other peritoneal pathologies such as peritoneal metastasis and post-surgical adhesions. Peritoneal metastasis is a complication of abdominal carcinomas (e.g. ovarian carcinoma) for which there is no effective therapy. Progression of the metastatic implants is affected by Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs), which can derive from several cell types. We have shown in human peritoneal implant biopsies that a subpopulation of CAFs derives from mesothelial cells through EMT. Our results also suggest that this EMT renders the peritoneum more receptive to implantation of tumour cells and, at the same time, contributes to the growth of secondary tumours and favours their vascularization. Adhesions are areas of fibrotic tissue that bind tissues and organs that would normally not be connected, and can be seriously life-threatening. Most adhesions are post-surgical. The physiopathological processes involved in their formation remain unknown. Histological analysis of human post-surgical adhesions has demonstrated that the mesothelial cells adjacent to the fibrotic tissue show signs of an EMT, suggesting that this could be an initial step in their development.

The aim of 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, and 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

Strippoli R, Loureiro J, Moreno V, Benedicto I, Pérez Lozano ML, Barreiro O, Pellinen T, Minguet S, Foronda M, Osteso MT, Calvo E, Vázquez J, López-Cabrera M, Del Pozo MA (2014). Caveolin-1 deficiency induces a MEK-ERK1/2-Snail-1-dependent epithelial-mesenchymal transition and fibrosis during peritoneal dialysis. *EMBO Mol Med*. 7:102-123.

González-Mateo GT, Fernández-Millara V, Bellón T, Liappas G, Ruiz-Ortega M, López-Cabrera M, Selgas R, Aroeira LS. (2014). Paricalcitol reduces peritoneal fibrosis in mice through the activation of regulatory T cells and reduction in IL-17 production. *PLoS One*. 9: e108477.

Sanz AB, Aroeira LS, Bellon T, del Peso G, Jimenez-Heffernan J, Santamaria B, Sanchez-Niño MD, Blanco-Colio LM, Lopez-Cabrera M, Ruiz-Ortega M, Egido J, Selgas R, Ortiz A. (2014). TWEAK promotes peritoneal inflammation. *PLoS One*. 9: e90399.

López-Cabrera M. (2014). Mesenchymal Conversion of Mesothelial Cells is a Key Event in the Pathophysiology of the Peritoneum during Peritoneal Dialysis. *Advances in Medicine*, 2014. Article ID 473134.

Rodriguez-Díez R, Aroeira LS, Orejudo M, Bajo MA, Heffernan JJ, Rodríguez-Díez RR, Rayego-Mateos S, Ortiz A, González-Mateo G, López-Cabrera M, Selgas R, Egido J, Ruiz-Ortega M. (2014). IL-17A is a novel player in dialysis-induced peritoneal damage. *Kidney Int*. 86:303-315.

Sandoval P, Jiménez-Heffernan JA, Rynne-Vidal Á, Pérez-Lozano ML, Gilsanz Á, Ruiz-Carpio V, Reyes R, García-Bordas J, Stamatikis K, Dotor J, Majano PL, Fresno M, Cabañas C, López-Cabrera M. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *J Pathol*. 231: 517-531.

Loureiro J, Sandoval P, del Peso G, González-Mateo G, Fernández-Millara V, Santamaria B, Bajo MA, Sánchez-Tomero JA, Guerra-Azcona G, Selgas R, López-Cabrera M, Aguilera AI. (2013). Tamoxifen ameliorates peritoneal membrane damage by blocking mesothelial to mesenchymal transition in peritoneal dialysis. *PLoS One*. 8: e61165.

Pérez-Lozano ML, Sandoval P, Rynne-Vidal A, Aguilera A, Jiménez-Heffernan JA, Albar-Vizcaino P, Majano PL, Sánchez-Tomero JA, Selgas R, López-Cabrera M. (2013). Functional relevance of the switch of VEGF receptors/co-receptors during peritoneal dialysis-induced mesothelial to mesenchymal transition. *PLoS One*. 8: e60776.

Loureiro J, González-Mateo G, Jimenez-Heffernan J, Selgas R, López-Cabrera M, Aguilera Peralta A. (2013). Are the Mesothelial-to-Mesenchymal Transition, Sclerotic Peritonitis Syndromes, and Encapsulating Peritoneal Sclerosis Part of the Same Process? *Int J Nephrol*. 2013:263285.

Aguilera A, Loureiro J, González-Mateo G, Selgas R, López-Cabrera M. (2013). The mesothelial to mesenchymal transition a pathogenic and therapeutic key for peritoneal membrane failure.

The latest in Peritoneal Dialysis. 2013. PÁGINAS, INICIAL/FINAL: 21-37 EDITORIAL: In Tech, open science, open mind. Eds; A. Aguilera.

Otras actividades / Other activities

Manuel López-Cabrera. Miembro del Comité Organizador.

Congreso: 15th Congress of the International Society for Peritoneal Dialysis (ISPD2014)

Lugar celebración: Madrid.

(Del 7 al 10 de Septiembre de 2014).

Tesis doctorales / Doctoral theses

María Luisa Pérez Lozano (2013). Transición epitelio-mesénquima inducida durante la diálisis peritoneal: efecto de los líquidos biocompatibles e importancia funcional de VEGF y sus receptores. Autómatoma de Madrid. Facultad de Medicina. Manuel López Cabrera, Rafael Selgas Gutiérrez.

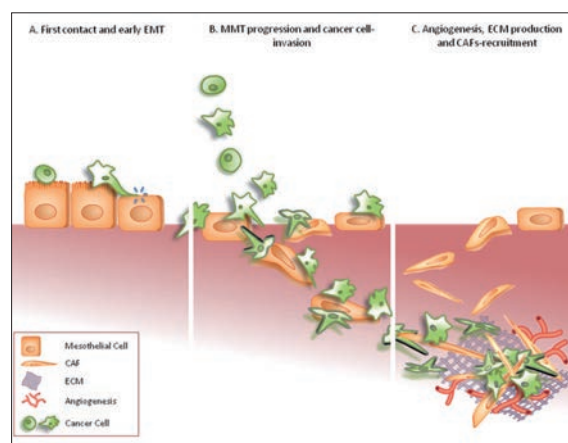


Figura 2. La diseminación peritoneal es una ruta frecuente de metástasis para los cánceres de ovario y del tracto gastrointestinal. Nosotros hemos demostrado que en los implantes metastásicos peritoneales una subpoblación de fibroblastos asociados a carcinoma (CAFs) derivan de las células mesoteliales 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.

Inmunología de los antígenos de histocompatibilidad

Immunology of human histocompatibility antigens



Jefe de Línea / Group Leader:

José A. López de Castro Álvarez

Postdoctorales/ Postdoctoral Fellows:

Patricia Gómez (Hasta el 31/01/2013)

Becarios Predoctorales / Graduate Students:

Carlos Álvarez Navarro

Adrián Martín Esteban

Alejandro Sanz Bravo

Estudiantes de Máster y Visitantes /

Master and Visiting Students:

Pablo Guasp Baratech

Weil Obeid

Resumen de investigación

HLA-B*27, PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y PATOGENIA DE LAS ESPONDILOARTROPATÍAS. La aminopeptidasa ERAP1 recorta péptidos al tamaño óptimo de los ligandos de MHC-I. La asociación conjunta de ERAP1 y HLA-B*27 con espondilitis anquilosante (AS) sugiere un papel patogénico del peptidoma de esta molécula. La artritis reactiva, otra espondiloartropatía asociada a HLA-B*27, se inicia por bacterias como *Chlamydia trachomatis*. El mimetismo molecular entre ligandos propios y bacterianos de HLA-B*27 podría influir en esta enfermedad. Nuestros estudios recientes han abordado: 1) El papel del polimorfismo de ERAP1 en el procesamiento y configuración del peptidoma de HLA-B*27, y 2) el procesamiento endógeno de epítomos de *C. trachomatis* restringidos por HLA-B*27 y su similitud con ligandos humanos de este antígeno. Estudios *in vitro* demostraron que el polimorfismo de ERAP1 asociado con AS modifica el procesamiento de ligandos de HLA-B*27 de manera dependiente de la variante enzimática y del ligando, alterando el balance generación/destrucción de éste. Mutaciones co-existentes modifican la actividad enzimática mediante efectos combinados. El polimorfismo de ERAP1 alteró substancialmente el peptidoma endógeno de HLA-B*27 por un mecanismo dependiente de la susceptibilidad de los residuos peptídicos N-terminales a la hidrólisis y del volumen de los residuos en otras posiciones. Estas observaciones explican la asociación de ERAP1 con AS mediante la alteración de la presentación antigénica y/o otras propiedades de HLA-B*27 dependientes de péptido. Estudios de inmunopeptidómica comparativa sugirieron una mayor influencia de ERAP1 sobre los subtipos de HLA-B*27 asociados que sobre los no asociados con AS. Asimismo demostramos el procesamiento y presentación endógenos de varios ligandos de HLA-B*27 procedentes de proteínas de *C. trachomatis*. Uno de estos péptidos mostró una similitud substancial de secuencia y conformación con un ligando natural de HLA-B*27, demostrando así la existencia de mimetismo molecular entre epítomos bacterianos y humanos procesados endógenamente y presentados por HLA-B*27.

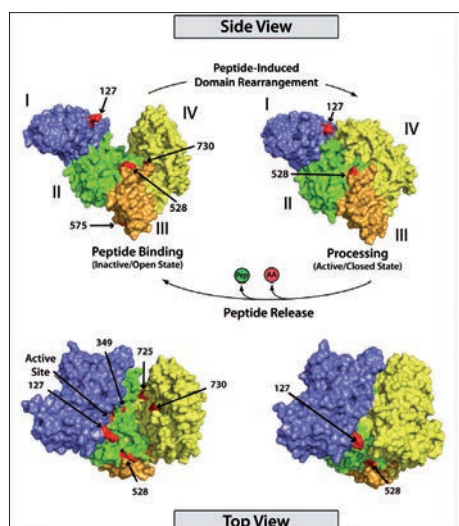


Figura 1. Estructura de ERAP1, posible mecanismo de acción y topología del polimorfismo asociado a espondilitis anquilosante. Vistas lateral y superior de ERAP1 mostrando las conformaciones abierta (inactiva) y cerrada (activa) y la localización de los polimorfismos asociados a espondilitis anquilosante en la estructura tridimensional de la molécula (Álvarez-Navarro and López de Castro, 2014, Mol. Immunol. 57: 12-21).

Figure 1. ERAP1 structure, presumed mechanism and topology of ankylosing spondylitis-associated polymorphism. Side and top views of ERAP1 showing the open (inactive) and closed (active) conformations and the localization of ankylosing spondylitis-associated polymorphisms in the three-dimensional structure of the molecule (Álvarez-Navarro and López de Castro, 2014, Mol. Immunol. 57: 12-21).

Research summary

HLA-B27, ANTIGEN PROCESSING AND THE PATHOGENESIS OF SPONDYLOARTHROPATHIES. The endoplasmic reticulum aminopeptidase (ERAP1) trims peptides to their optimal size for binding to Major Histocompatibility Complex class I (MHC-I) molecules. The joint association of HLA-B*27 and ERAP1 with ankylosing spondylitis (AS) suggests a pathogenetic role of HLA-B*27-bound peptides. Reactive arthritis, another HLA-B*27-associated spondyloarthropathy, is triggered by intracellular bacteria, such as *Chlamydia trachomatis*. Molecular mimicry between bacterial and self-derived HLA-B27-restricted antigens might influence the pathogenesis of this disease or its chronic evolution. Our recent studies addressed: 1) the role of ERAP1 polymorphism in processing HLA-B*27 ligands and shaping the HLA-B27-bound peptidome, and 2) the endogenous processing of HLA-B*27-restricted epitopes from *C. trachomatis* and their similarities with human-derived HLA-B*27 ligands. In vitro studies using recombinant ERAP1 variants demonstrated that AS-associated ERAP1 polymorphism influences the processing of HLA-B*27 ligands in a variant and peptide-dependent way by altering their generation/destruction balance and that co-occurring amino acid changes influence the enzymatic activity through mutually dependent effects. ERAP1 polymorphism significantly altered the HLA-B*27-bound peptidome expressed in living cells in a way dependent on the susceptibility of the N-terminal peptide residues to trimming and the size of other amino acid side chains at multiple positions. These alterations explain the association of ERAP1 with AS by a mechanism based on altering the antigen-presenting and/or other peptide-dependent features of HLA-B*27. Further supporting this conclusion, comparative immunopeptidomics suggested a larger influence of ERAP1 polymorphism on AS-associated compared to non-AS-associated HLA-B*27 subtypes. In other studies we demonstrated the endogenous processing and presentation of various HLA-B*27-restricted peptides from *C. trachomatis*, all of which showed significant homology with human-derived protein sequences. One of these peptides further showed significant sequence and conformational similarity with a human-derived HLA-B*27 ligand, demonstrating molecular mimicry between naturally processed chlamydial and self-derived HLA-B*27-restricted epitopes.

Publicaciones / Publications

Alvarez-Navarro, C., Cragolini, J.J., Dos Santos, H.G., Barnea, E., Admon, A., Antonio Morreale, A., and López de Castro, J.A. (2013) Novel HLA-B27-restricted epitopes from *Chlamydia trachomatis* generated upon endogenous processing of bacterial proteins suggest a role of molecular mimicry in reactive arthritis. *J. Biol. Chem.* **288**: 25810–25825.

Alvarez-Navarro and López de Castro, J.A. (2013) ERAP1 in ankylosing spondylitis: genetics, biology and pathogenetic role. *Curr. Opin. Rheumatol.* **25**: 419–425.

López de Castro, J.A. (2014) The pathogenesis of ankylosing spondylitis: HLA-B27 and beyond [editorial]. *Mol. Immunol.* **57**: 1.

Alvarez-Navarro, C. and López de Castro, J.A. (2014) ERAP1 structure, function and pathogenetic role in ankylosing spondylitis and other MHC-associated diseases. *Mol. Immunol.* **57**: 12–21.

Martín- Esteban, A., Gómez-Molina, P., Sanz-Bravo, A. and López de Castro, J. A. (2014). Combined effects of ankylosing spondylitis-associated ERAP1 polymorphisms outside the catalytic and peptide-binding sites on the processing of natural HLA-B27 ligands. *J. Biol. Chem.* **289**: 3978–3990.

García-Medel, N. Sanz-Bravo, A., Alvarez-Navarro, C., Gómez-Molina, P., Barnea, E., Marcilla, M. Admon, A. and López de Castro, J.A. (2014) Peptide handling by HLA-B27 subtypes influences their biological behavior, association with ankylosing spondylitis and susceptibility to ERAP1. *Mol. Cell Proteomics* **13**: 3367–3380.

Otras actividades / Other activities

José A. López de Castro. Guest Editor of the following special Issue: The Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis: HLA-B27 and Beyond. *Mol. Immunol*, Vol. 57, Issue 1, January 2014.

Mecanismos de señalización y regulación de receptores acoplados a proteínas G

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



Jefe de Línea / Group Leader:
Federico Mayor

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

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Rocío Vila Bedmar
Guzmán Sánchez Fernández
(Marzo 2013-marzo 2014)
Laura Nogués Vera

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Sofía Cabezudo
Marta Cruces

Elisa Lucas
Adolfo Javier Molejón
Julia Palacios
Clara Reglero
Verónica Rivas

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:
Susana Rojo-Berciano
Paula Ramos
Almudena Santos
(Hasta abril 2014)

Estudiantes / Undergraduate Students:
Arisbel Batista
Álvaro Caballero

Resumen de investigación

Estamos interesados en investigar nodos de señalización relevantes en patologías prevalentes con la edad, como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares/metabólicas. La quinasa GRK2 es uno de esos nodos. Además de su papel canónico regulando receptores acoplados a proteínas G (GPCR), GRK2 modula múltiples funciones celulares mediante la interacción y/o fosforilación de otros componentes de las cascadas de transducción como HDAC6, IRS1, EPAC, Mdm2, Smads o p38Mapk. Estas interacciones integradas de GRK2 explican su papel en el control de la migración, angiogénesis o resistencia a insulina (RI). Los niveles de GRK2 se alteran en pacientes en procesos tumorales, inflamatorios y en enfermedades cardiovasculares/metabólicas relacionadas con la RI. Perseguimos entender cómo los cambios que experimenta GRK2 en diferentes tipos celulares y tejidos se integran a nivel celular y del organismo, y cómo pueden fomentar la progresión de estas patologías, utilizando modelos celulares y animales (ratones hemizigotos y GRK2-deficientes inducibles o específicos de tejido). Así, investigamos cómo alteraciones de GRK2 en los diferentes tipos de células de los tumores (epiteliales tumorales, endoteliales, inmunes) pueden actuar de forma sinérgica para promover distintos aspectos de la progresión tumoral (proliferación, supervivencia, senescencia, inestabilidad genómica, angiogénesis o invasión metastática) a través de sus interacciones con GPCR y con los ejes de señalización Mdm2/p53 o HDAC6, entre otros.

Por otra parte, estudiamos GRK2 como integrador de cascadas de señalización en patologías relacionadas con la RI en diferentes tejidos y tipos celulares (adiposo, hígado, páncreas, corazón o macrófagos/células inmunes), modulando tanto la señalización por insulina como la mediada por GPCRs que controlan la homeostasis metabólica, la sensibilidad a insulina o la detección de nutrientes. Otro nodo de señalización relacionado con GRK2 es la proteína Gαq. Hemos desvelado nuevas interacciones de Gαq con proteínas con dominios PB1 como PKCζ y exploramos las repercusiones funcionales de este nuevo interactoma en procesos de muerte celular, autofagia y estrés oxidativo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

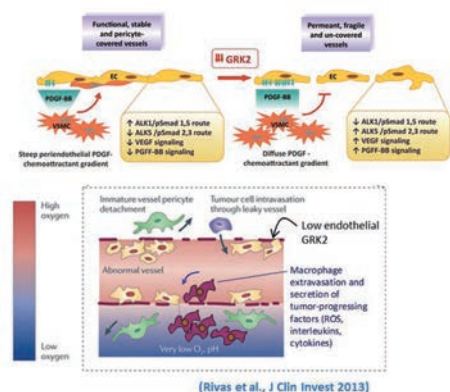


Figura 1. Los niveles de GRK2 en endotelio son relevantes en la progresión tumoral.

Figure 1. GRK2 downregulation is a relevant event in the tumoral angiogenic switch.

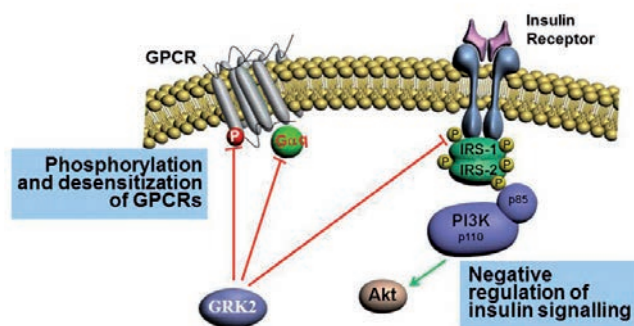


Figura 2. GRK2 como integrador de señales que controlan el metabolismo.

Figure 2. GRK2 as an integrator of metabolic signaling.

Research summary

Our laboratory is investigating key nodes in signalling networks involved in prevalent age-related pathologies such as metabolic/cardiovascular diseases and cancer. The GRK2 kinase is one of those key signalling hubs. In addition to its canonical role as a regulator of G protein-coupled receptors (GPCR), GRK2 can also impact cell signalling networks by directly interacting and/or phosphorylating non-GPCR components of transduction cascades (such as HDAC6, IRS1, PI3K, EPAC, Mdm2, Smads or p38 Mapk). Such integrated interactions underlie the participation of GRK2 in the control of cell migration, angiogenesis or insulin resistance (IR). GRK2 levels/activity are altered in human pathologies such as cancer, inflammation and cardiovascular/ metabolic diseases related to IR. We seek to understand how concurrent changes in GRK2 levels (involving different cell types and tissues) integrate at the cellular and organism level, and how they can foster disease progression, by using cellular and animal models (including hemizygous, conditional and tissue-specific GRK2-deficient animals). We investigate how changes in GRK2 expression in different tumor cell types (tumoral, macrophages and endothelial cells) might act synergistically to promote different aspects of tumor progression (proliferation, survival, senescence, genomic stability, angiogenesis, metastatic invasion) by modulating either GPCRs, HDAC6 or the Mdm2/p53 signaling axis, among others.

On the other hand, we analyze the GRK2 hub as a central integrator of signaling cascades relevant to IR-related pathologies and co-morbidities in different tissues and cell types (adipose, liver, pancreas, heart, macrophages/immune cells), by simultaneously modulating both the insulin cascade and key GPCRs controlling metabolic homeostasis, nutrient sensing or insulin secretion/sensitivity. Other signaling node related to GRK2 is Gαq. We have unveiled novel interactions of Gαq with PB1-domain containing proteins such as PKCζ, and we are investigating the functional impact of this new Gαq interactome in cell death, autophagy and oxidative stress processes and in the development of cardiovascular diseases.

Publicaciones / Publications

Penela P, Nogués L, Mayor F. (2014) Role of G protein-coupled receptor kinases in cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* **27**, 10-17.

Rivas V, Nogués L, Reglero C, Mayor Jr. F and Penela P. (2014). Role of G protein-coupled receptor kinase 2 in tumoural angiogenesis. *Mol. Cell. Oncol.* **1**:4 e969166-1_e969166-11

Lucas E, Jurado-Pueyo M, Fortuño MA, Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Jiménez-Borreguero LJ, Lazcano JJ, Gao E, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Koch WJ, Díez J, Mayor F Jr, Murga C (2014) Downregulation of G protein-coupled receptor kinase 2 levels enhances cardiac insulin sensitivity and switches on cardioprotective gene expression patterns. *Biochim Biophys Acta. Mol Basis Disease* **1842**, 2448-2256.

García-Guerra L, Vila-Bedmar R, Carrasco-Rando M, Cruces-Sande M, Martín M, Ruiz-Gómez A, Ruiz-Gómez M, Lorenzo M, Fernández-Veledo S, Mayor F Jr, Murga C, Nieto-Vázquez I (2014) Skeletal muscle myogenesis is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Mol Cell Biol.* **6**, 299-311.

Willemsen HL, Campos PM, Lucas E, Morreale A, Gil-Redondo R, Agut J, González FV, Ramos P, Heijnen C, Mayor F Jr, Kavelaars A, Murga C. (2014) A novel p38 MAPK docking-groove-targeted compound is a potent inhibitor of inflammatory hyperalgesia. *Biochem J.* **459**, 427-439.

Fernández-Arenas E, Calleja E, Martínez-Martín N, Gharbi SI, Navajas R, García-Medel N, Penela P, Alcamí A, Mayor F Jr, Albar JP, Alarcón B. (2014). β-arrestin-1 mediates the TCR-triggered re-routing of distal receptors to the immunological synapse by a PKC-mediated mechanism. *EMBO J.* **33**, 559-577.

Sánchez-Fernández G, Cabezu S, García-Hoz C, Benincá C, Aragay AM, Mayor F Jr, Ribas C. (2014) Gαq signalling: The new and the old. *Cell Signal.* **26**, 833-848.

Avendaño MS, Lucas E, Jurado-Pueyo M, Martínez-Revelles S, Vila-Bedmar R, Mayor F Jr, Salas M, Briones AM, Murga C. (2014) Increased Nitric Oxide Bioavailability in Adult GRK2 Hemizygous Mice Protects Against Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension.* **63**,369-375

Sánchez-Fernández G, Cabezu S, García-Hoz C, Tobin AB, Mayor F Jr, Ribas C. (2013) ERK5 Activation by Gq-Coupled Muscarinic Receptors Is Independent of Receptor Internalization and β-Arrestin Recruitment. *PLoS One.* **8**, e84174

Rivas, V, Carmona, R, Muñoz-Chápoli, R, Mendiola, M, Nogués, L, Reglero, C, Miguel-Martín, M, García-Escudero, R, Dom II, G. W, Hardisson, D, Mayor, jr. F and Petronila P (2013) GRK2 regulates physiological and tumoural vascularization. *Journal of Clinical Investigation*, **123**, 4714-4730.

Otras actividades / Other activities

Federico Mayor:

Director del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid/ Chairman, Department of Molecular Biology. Universidad Autónoma de Madrid (2005- 2013).

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

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-); Instituto de Investigación Sanitaria de La Princesa (2010-); Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez-Díaz (2012-).

Cristina Murga:

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

Vicedirectora / Deputy Director CBMSO (2014-).

Patentes / Patents

C.J. Heijnen; Antonio Morreale; Federico Mayor Menéndez; Cristina Murga Montesino; Pedro Manuel Campos; Anne Kavelaars "Protection of the effects of p38 inhibitory compounds" Cód. de referencia/registro: WO 2013/064714 Número de solicitud: PCT/ES2012/070762. País de prioridad: España, Comunidad de Madrid Fecha de concesión: 10/05/2013 Entidad titular: FUNDACION GENERAL DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID FUAM

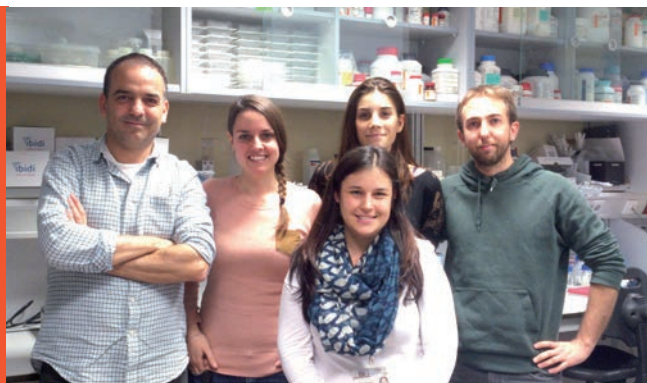
Tesis doctorales / Doctoral theses

Guzmán Sánchez Fernández (2013). Characterization of Gαq-coupled receptor signalling via the novel effector PKCζ. Universidad Autónoma de Madrid. Ciencias. Apto "cum laude". Mención de Doctorado Internacional. Directores: Federico Mayor Menéndez y Catalina Ribas.

Laura Nogués Vera (2014). GRK2 as a new onco-modulator of breast tumoural transformation through the regulation of the P53/MDM2 axis. Universidad Autónoma de Madrid. Universidad Autónoma de Madrid. Ciencias. Apto "cum laude". Mención de Doctorado Europeo. Directores: Federico Mayor Menéndez y Petronila Penela Márquez.

Biología celular de la inflamación

Cell biology of inflammation



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Jaime Millán Martínez

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Natalia Reglero Real (2014)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Natalia Reglero Real (2013)
Beatriz Marcos Ramiro
Diana Santander García
Diego Garcia Weber

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Susana Barroso Fernández

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Gema Fernández Estradé
Adrián Álvarez Varela
Helena Cantero Hernández
Carla De la Huerta López

Resumen de investigación

La inflamación forma parte de la primera respuesta inmunitaria frente a las infecciones, el daño tisular o el estrés. Además, la inflamación crónica o patológica conduce a la aparición de enfermedades como la esclerosis múltiple, la aterosclerosis o la hepatitis. Las respuestas inflamatorias prolongadas están mediadas por la secreción de factores solubles como la citoquina TNF, que induce la alteración progresiva de las barreras celulares en el tejido y el reclutamiento de células inmunitarias hacia el foco de inflamación. Con la finalidad de encontrar dianas para controlar la respuesta inflamatoria, nuestro grupo está interesado en estudiar los mecanismos moleculares que median el efecto de TNF sobre la función de barrera celular. Las células endoteliales forman una barrera selectiva que controla la extravasación de solutos y células desde el torrente sanguíneo. Hemos investigado la regulación mutua entre adhesión leucocitaria y permeabilidad endotelial. TNF regula la expresión y localización de los receptores de adhesión leucocitarios ICAM-1 y PECAM-1. Hemos demostrado que estos receptores además modulan la permeabilidad endotelial durante la inflamación.

Cuando los leucocitos atraviesan la barrera endotelial se infiltran en el tejido buscando el foco de inflamación e interactúan con otras barreras celulares. Tomando células epiteliales de hígado como modelo, hemos demostrado la importancia de la polaridad apicobasal de estas barreras en el control de la adhesión linfocitaria. ICAM-1 se confina en el dominio apical de las células epiteliales polarizadas y no es accesible a los linfocitos. Cuando la célula enferma y se despolariza, ICAM-1 se expone e incrementa la adhesión linfocitaria. Una estimulación persistente con TNF provoca además una despolarización de ICAM-1 sin pérdida de polaridad apicobasal. La polaridad apicobasal de los receptores de adhesión podría ser, por tanto, un control en el tejido para que, en un mismo contexto inflamatorio, el sistema inmunitario discrimine células sanas y polarizadas de aquellas disfuncionales, despolarizadas y altamente inflamadas.

Finalmente, hemos comenzado un proyecto de colaboración con el Servicio de Oftalmología de la Fundación Jiménez Díaz en el que estudiamos los mecanismos moleculares que median la disfunción de la barrera endotelial de córnea durante la inflamación, con resultados iniciales muy prometedores.

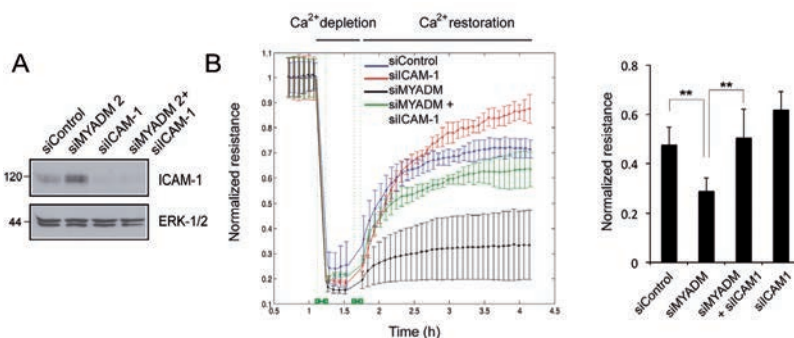


Figura 1. ICAM-1 media la alteración de la barrera endotelial en respuesta a la reducción de la proteína MYADM, que induce un fenotipo inflamatorio, similar al producido por TNF. (A) Efecto de los siRNAs indicados sobre la expresión de ICAM-1 en HUVECs. siMYADM incrementa la expresión de ICAM-1. (B,C) Efecto del "calcium switch" sobre la resistencia transendotelial de monocapas de HUVECs transfectadas con los siRNA indicados, medida con un sistema ECIS. El siRNA específico para ICAM-1 (siICAM-1) inhibe la alteración de la función de barrera endotelial (resistencia normalizada) causada por siMYADM. (De Aranda et al. 2013)

Figure 1. ICAM-1 mediates endothelial barrier dysfunction in response to MYADM knockdown, which induces a pro inflammatory phenotype, similar to that induced by TNF. (A) MYADM knockdown (siMYADM) increases ICAM-1 expression. (B,C) ECIS assay in which the effect of siMYADM on endothelial barrier recovery after calcium switch is corrected by siRNA targeting ICAM-1 (siICAM-1) (from Aranda et al. 2013).

Research summary

Inflammation is a primary response to infection, stress and injury during the innate immune defense. Pathological and chronic inflammation leads to diseases such as multiple sclerosis, atherosclerosis or hepatitis. Long-term inflammatory responses are orchestrated by the secretion of soluble factors such as the cytokine TNF, which facilitates the recruitment of immune cells to damaged tissue areas by disrupting cellular barriers. We investigate the molecular mechanisms that mediate the effect of TNF on different cell barriers. Endothelial cells line the inner surface of the vascular wall, where they form a selective barrier that controls the passage of cells and solutes between the blood and the inflamed parenchyma. In recent years, we have been analyzing how TNF alters the localization and expression of receptors involved in leukocyte transendothelial migration, namely PECAM-1 and ICAM-1. We have found that these receptors also regulate endothelial permeability and cell-to-cell junctions.

Once leukocytes traverse the endothelial barrier, they establish adhesions with parenchymal cells, searching for the inflammatory focus and for dysfunctional cells. The liver is a paradigm of organ in which leukocyte infiltration is essential for immune-surveillance, the control of cancer and infections and tissue regeneration. We have demonstrated the importance of apicobasal polarity in preventing leukocyte adhesion to hepatic epithelial cell barriers. ICAM-1 is the main adhesion receptors mediating leukocyte haptotaxis in parenchymal epithelial cells. We have found that polarized epithelial cells confine ICAM-1 in their apical domains, which are not accessible to immune cells. Upon cell depolarization or persistent stimulation with TNF, ICAM-1 is exposed and leukocyte adhesion increases. Hence, in dysfunctional hepatic parenchyma, leukocytes appear to discriminate between operative, polarized hepatic cells and damaged or chronically inflamed adjacent hepatocytes that expose their adhesion machinery.

Finally, in a collaborative project with the Service of Ophthalmology of the Jiménez Díaz Foundation, we have initiated the study of the inflammatory responses of corneal endothelial barriers. We are investigating the molecular mechanisms involved in actin-mediated cell contraction and corneal endothelial barrier disruption with promising results.

Publicaciones / Publications

Reglero-Real, R., Álvarez-Varela, A., Cernuda-Morollón, E., Feito, J., Marcos-Ramiro, B., Fernández-Martín, L., Gómez-Lechón, M.J., Muntané, J., Sandoval, P., Majano, P.L., Correas, I., Alonso, M.A. and Millán, J. (2014) Apicobasal polarity controls lymphocyte adhesion to hepatic epithelial cells. *Cell Rep.* **8**(6), 1879–1893.

Marcos-Ramiro, B., García-Weber, D. and Millán, J. (2014) TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. *Thromb. Haemost.* **12**(6):1088–1102.

Marcos-Ramiro, B., Oliva-Nacarino, P., Serrano-Pertierra, E., Blanco-Gelaz, M.A., Weksler, B.B., Romero, I.A., Couraud, P.O., Tuñón, A., Lopez-Larrea, C., Millán, J., and Cernuda-Morollón, E. Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function. *BMC Neuroscience*; 2014, **15**:110.

Aranda, J.F., Reglero-Real, N., Marcos-Ramiro, B., Ruiz-Sáenz, A., Fernández-Martín, L., Bernabé-Rubio, M., Kremer, L., Ridley, A.J., Correas, I., Alonso, M.A. and Millán, J. (2013) MYADM controls endothelial barrier function through ERM-dependent regulation of ICAM-1 expression. *Mol. Biol. Cell.* **24**, 483–494.

Ruiz-Saenz, A., van Haren, J., Sayas, L., Rangel, L., Demmers, J., Millán, J., Alonso, M.A., Galjart, N. and Correas, I. (2013) Protein 4.1R binds to CLASP2 and regulates dynamics, organization and attachment of microtubules to the cell cortex. *J. Cell Sci.* **15**(126), 4589–4601.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Natalia Reglero Real (2013). Función de la polaridad apicobasal de las células hepáticas en la adhesión linfocitaria. Implicaciones en la respuesta inflamatoria del hígado. Universidad Autónoma de Madrid. Director. Jaime Millán Martínez. Co-director. Miguel Ángel Alonso Lebrero.

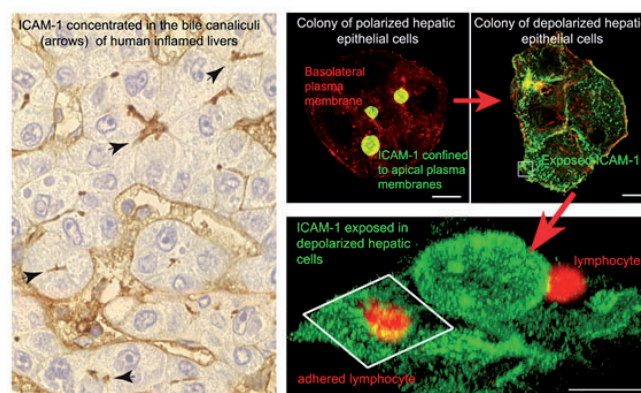
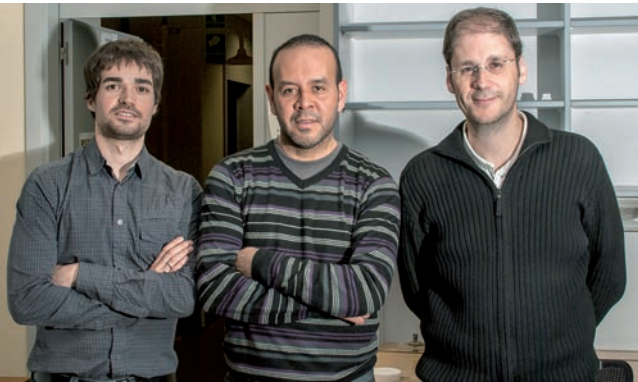


Figura 2. Parte izquierda. Inmunodetección de ICAM-1 en hígado rechazado tras un trasplante. El canalículo biliar constituye el dominio apical de los hepatocitos polarizados. ICAM-1 (flechas) se confina en la parte apical de las células epiteliales de hígado (hepatocitos y colangiocitos) que permanecen sanas y funcionales en un ambiente inflamatorio. Parte derecha. La pérdida de polaridad apicobasal expone ICAM-1 a los linfocitos e incrementa su adhesión. (De Reglero-Real et al., 2014).

Figure 2. Apicobasal polarity controls lymphocyte adhesion to hepatic epithelial cells. Left panel. Immunohistochemistry of ICAM-1 in rejected human liver allografts. The bile canaliculi are the apical membrane domains of polarized hepatocytes. ICAM-1 is confined in the apical domain of polarized hepatic cells (hepatocytes and cholangiocytes) (arrows). Right panels. Loss of apicobasal polarity exposes ICAM-1 to the extracellular milieu and increases lymphocyte adhesion to hepatic cells (from Reglero-Real, 2014).

Papel del remodelado de la matriz extracelular en el sistema cardiovascular

Extracellular matrix remodeling in the cardiovascular system



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Fernando Rodríguez Pascual

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
José González Santamaría

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Óscar Busnadiego Prieto

Resumen de investigación

En los últimos años el concepto global sobre las funciones de la matriz extracelular ha evolucionado desde una visión tradicional que la consideraba un material orgánico de relleno entre células y tejidos, a un modelo más sofisticado de biomaterial dinámico que además de servir de sostén de los tejidos, les proporciona sus propiedades de dureza y elasticidad, así como aporta puntos de interacción con receptores celulares o de control para la disponibilidad de determinados factores de crecimiento.

En vertebrados, la matriz extracelular determina las propiedades biomecánicas de los tejidos vasculares y cardíacos, un aspecto de extraordinaria relevancia en el contexto de las patologías cardiovasculares. La familia de enzimas de las lisil oxidasas cataliza la formación de entrecruzamientos covalentes en las fibras de colágeno y elastina y, de este modo, estas proteínas constituyen factores determinantes de las propiedades de estabilidad y dureza de la matriz. En nuestro grupo investigamos los mecanismos moleculares que controlan la expresión y la actividad de las lisil oxidasas, así como su relevancia patofisiológica en el contexto de las enfermedades cardiovasculares, con interés particular en el desarrollo de enfermedades fibróticas como la fibrosis pulmonar o renal, y también en las complicaciones vasculares asociadas al Síndrome de Marfán y otras alteraciones del tejido conectivo. Mediante aproximaciones *in vitro* e *in vivo*, nuestro laboratorio analiza la contribución de esta familia de enzimas a las propiedades estructurales y funcionales de la matriz extracelular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, así como su validación como dianas terapéuticas con aplicación en clínica.

En este contexto, nuestro grupo ha descrito la capacidad de la citoquina profibrótica TGF-beta de inducir la expresión de la isoforma 4 de lisil oxidasa (LOXL4) y su contribución a la deposición de matriz extracelular en el endotelio vascular.

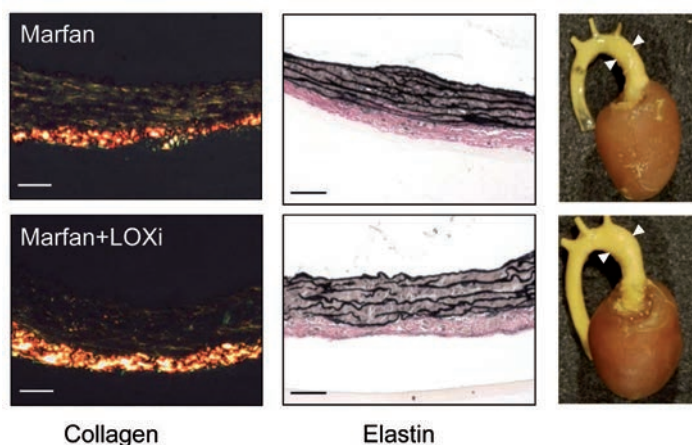


Figura 1. La inhibición de la actividad enzimática de lisil oxidasa disminuye la acumulación de colágeno, desorganiza la red de fibras de elastina y potencia el desarrollo de aneurisma de aorta en un modelo de ratón del Síndrome de Marfán.

Figure 1. Inhibition of lysyl oxidase activity reduces the accumulation of collagen, disorganizes the elastin fiber network, and results in a potentiation of the aortic aneurysm in a mouse model of Marfan Syndrome.

Research summary

Over the years, our understanding of the functions of the extracellular matrix has evolved from the traditional concept of a static “glue” holding cells into tissues to the more sophisticated one of a dynamic biomaterial that provides strength and elasticity, as well as points of interactions with cell surface receptors, and availability of growth factors.

In vertebrates, the extracellular matrix plays an essential role in determining the mechanical properties of the vascular and cardiac tissues, an aspect of special relevance in the context of the development of cardiovascular diseases. Lysyl oxidase family of enzymes catalyze the formation of cross-linkages in collagen and elastin fibers and therefore are essential factors in the process of stabilization and maturation of the extracellular matrix. Our group investigates the molecular mechanisms that control the expression and activity of lysyl oxidase enzymes, as well as the pathophysiological relevance of these factors in the context of cardiovascular diseases, with particular focus on their role in the development of fibrotic diseases such as lung or kidney fibrosis, and also on the vascular complications associated to Marfan syndrome and related connective tissue disorders. By using *in vitro* and *in vivo* approaches, our laboratory analyzes the contribution of these matrix-remodeling enzymes to extracellular matrix homeostasis in both health and disease, as well as their validation for potential medical application.

In this context, our group has recently described the capacity of the profibrotic cytokine TGF- β to induce the expression of the isoform lysyl oxidase-like 4 (LOXL4), and its contribution to the deposition of extracellular matrix components in the vascular endothelium.

Publicaciones / Publications

Busnadiego O, González-Santamaría J, Lagares D, Guinea-Viniegra J, Pichol-Thievent C, Muller L, Rodríguez-Pascual F (2013). LOXL4 is induced by transforming growth factor β 1 through Smad and JunB/Fra2 and contributes to vascular matrix remodeling. *Mol Cell Biol.* **33**(12):2388-2401.

Lenna S, Chrobak I, Farina GA, Rodríguez-Pascual F, Lamas S, Lafyatis R, Scorza R, Trojanowska M (2013). HLA-B35 and dsRNA induce endothelin-1 via activation of ATF4 in human microvascular endothelial cells. *PLoS One.* **8**(2):e56123.

Glineur C, Gross B, Neve B, Rommens C, Chew GT, Martin-Nizard F, Rodríguez-Pascual F, Lamas S, Watts GF, Staels B (2013). Fenofibrate inhibits endothelin-1 expression by peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent and independent mechanisms in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **33**(3):621-628.

Bretón-Romero R, Acín-Perez R, Rodríguez-Pascual F, Martínez-Molledo M, Brandes RP, Rial E, Enríquez JA, Lamas S (2014). Laminar shear stress regulates mitochondrial dynamics, bioenergetics responses and PRX3 activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* **1843**(11):2403-2413.

Rodríguez-Pascual F, Busnadiego O, González-Santamaría J (2014). The profibrotic role of endothelin-1: Is the door still open for the treatment of fibrotic diseases? *Life Sci.* **118**(2):156-164.

Rodríguez-Pascual F, Coto E. (2014) La biología molecular en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades renales. In: Nefrología Clínica 4ª edición. L. Hernando Ed. Médica Panamericana, 39-48.

Rodríguez-Pascual F, Caramelo C, Lamas S (2014) Fisiopatología de la pared vascular. In: Nefrología Clínica 4ª edición. L. Hernando Ed. Médica Panamericana, 255-268.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Oscar Busnadiego Prieto (2014): Central Role for TGF- β in extracellular matrix homeostasis . Fibrotic processes and vascular remodeling. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Fernando Rodríguez Pascual.

Homeostasis metabólica

Metabolic homeostasis



Jefe de Línea / Group Leader:

Ignacio Vicente-Sandoval

Personal Científico /

Scientific Staff:

Diego Pulido Vega

Vassiliki Lalioti

J. Predestinación Ruiz

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Inés Hernández Pérez

Manuela Pérez Berlanga

Resumen de investigación

EL Cu^+ es por su capacidad redox un elemento esencial y a la vez potencialmente peligroso por su capacidad de producir los altamente reactivos radicales $\text{OH}^\bullet$, susceptibles de atacar cualquier molécula en la célula. Dentro de la homeostasis del Cu^+ en el organismo, el hígado juega el papel fundamental de eliminar el exceso de Cu^+ por la bilis. Eliminamos el 95% del Cu^+ que ingerimos con la dieta y su retención origina cuprotoxicosis de las cuales la más conocida es la enfermedad de Wilson. ATP7B es la única bomba de Cu^+ que funciona en el hepatocito y como tal la única responsable de la eliminación del exceso de Cu^+ por la bilis. Aunque parezca increíble el lugar donde ATP7B funciona en la eliminación de Cu^+ en el hepatocito es sujeto de controversia. Distintos modelos han identificado como el sitio de funcionamiento de ATP7B los endosomas tardíos, los lisosomas y sorprendentemente prestan menos atención al canalículo biliar. Nuestros más recientes estudios describen el funcionamiento de ATP7B en la membrana del canalículo biliar y cómo en respuesta a la elevación en los niveles de Cu^+ celular ATP7B es liberado de la red *trans* del Golgi (TGN), es dirigido a la membrana basolateral del hepatocito, donde se inserta, y tras ser endocitado es transportado al dominio apical, donde tras atravesar el compartimento subapical se incorpora a la membrana del canalículo biliar. Los aspectos moleculares del transporte forman parte de este estudio. En paralelo hemos iniciado un estudio sistemático de los trastornos del transporte de ATP7B en el hepatocito asociados con la enfermedad de Wilson.

Continuando el estudio del funcionamiento de las ESyt, proteínas que han sido implicadas en el anclaje del retículo endoplásmico a la membrana plasmática (anteriormente estudiamos la regulación del transportador de glucosa por ESyt-1), hemos encontrado que la isoforma ESyt-3 se asocia a las gotas de grasa durante su biogénesis y que su silenciamiento hace que sean más numerosas y pequeñas, al tiempo que provoca la retracción celular. Además, estudiando sus elementos SBM y C2-1, C2-2 y C2-3 hemos observado que ESyt3 interacciona físicamente con gelsolina, proteína reguladora de la organización de la actina, y que estimula la capacidad de esta de fragmentar los filamentos de actina. Así mismo hemos identificado los fosfolípidos que reaccionan con los diferentes dominios de ESyt3 y el papel del Ca^{++} en estas interacciones.

Por último continuamos estudiando la estructura toroidal, constituida por IMPDH2, descrita en la anterior memoria y hemos finalizado el estudio de los “enhancers” de HDAC codificados en el gen C6orf89.

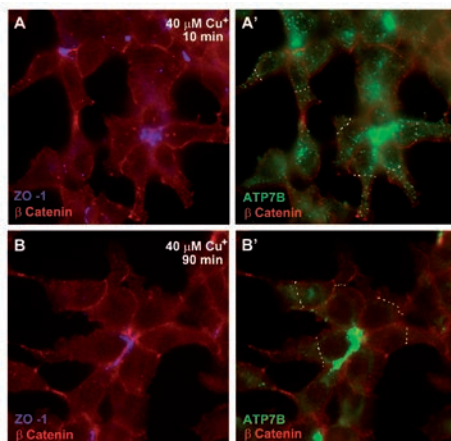


Figura 1. Translocación del transportador de Cu^+ , ATP7B, desde la red *trans* del Golgi (TGN) al canalículo biliar en respuesta al aumento en el Cu^+ celular. Obsérvese la liberación de ATP7B de la TGN y su temprana circulación a través del dominio basolateral de la célula (área comprendida entre líneas blancas y la β -catenina) tras 15 min de tratamiento con Cu^+ (A, A'), y su localización en el canalículo biliar tras 90 min de tratamiento (B, B').

Figure 1. Cu^+ -induced relocation of the Cu^+ transporter ATP7B from the *trans*-Golgi network to the bile canalculus in CAN 10 hepatoma cells. Cells treated with Cu^+ as indicated in the panels were studied for ATP7B location. Note the early transit of ATP7B through the cell basolateral domain (area delineated by the white dotted lines and the far end of the β catenin labelled plasma membrane) and the localization of ATP7B in the bile canalculi, sealed by the ZO-1 positive tight junctions, after extensive treatment with Cu^+ .

Research summary

The transition metal copper (Cu⁺) is an essential trace element for all biota. Its redox properties bestow Cu⁺ with capabilities that are simultaneously essential and potentially damaging to the cell. Free Cu⁺ is virtually absent in the cell. In mammals liver is the major captor, distributor and excretor of Cu⁺. Humans eliminate 95% of the Cu⁺ ingested with diet. The excretion of Cu⁺ into the bile is an attribute exclusive of the hepatocyte and bile is the major route of Cu⁺ elimination and the most important mechanism in Cu⁺ homeostasis in mammals. The correlation between the release of ATP7B retained in the trans-Golgi network (TGN) and the role of ATP7B in excretion of Cu⁺ into the bile is firmly established. Yet, the pathway of ATP7B transport is poorly understood and its site of action is the subject of a hot debate. Our studies of Cu⁺-mediated ATP7B traffic in CAN 10 hepatoma cells showed that after its release from the TGN, ATP7B is basolateral sorted, inserted in the basolateral plasma membrane and transported by transcytosis to the bile canaliculus (BC). Insertion of ATP7B into the membrane of the BC is essential for excreting excess of cellular Cu⁺ into the medium. Contradicting recent reports, our studies find no evidence of ATP7B association with lysosomes and do not support the recent model of Cu⁺ excretion mediated by lysosome exocytosis. In recent months we have started a systematic study of the mutations that disrupt ATP7B traffic and cause Wilson disease and cuprotoxicosis with a genetic background of wild ATP7B. In a separate studies we investigate the role of ESYT proteins in membrane dynamics and glucose and lipid metabolism in the adipocyte. New inroads in understanding the functioning of ESYT3, a protein associated with the endoplasmic reticulum (ER) that is believed to play a key role in anchoring the ER to the plasma membrane, include: the mapping of the Ca²⁺ and phospholipid binding to the BM y C2-1, C2-2 y C2-3 domains; the characterization of its physical interaction with gelsolin and the potentiation of this to sever actin filaments; its role in lipid droplet biogenesis. Finally, the study of the toroidal structure produced by polymerization of IMPDH2 is in progress and the study of the HDAC enhancer C6orf89 has been completed.

Publicaciones / Publications

DKWSLLL, a versatile DXXXLL-type signal with distinct roles in the Cu⁺-regulated trafficking of ATP7B. Lalioti V, Hernandez-Tiedra S, Sandoval IV. *Traffic*. 2014 Aug; **15**(8):839-60. 2014 Jun 24.

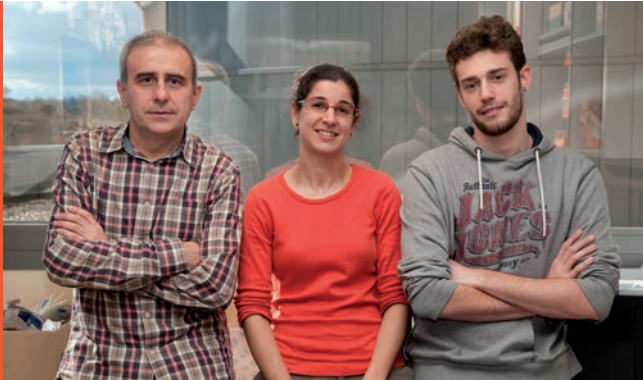
Sorcin links calcium signaling to vesicle trafficking, regulates Polo-like kinase 1 and is necessary for mitosis. Lalioti VS, Ilari A, O'Connell DJ, Poser E, Sandoval IV, Colotti G. *PLoS One*. 2014 Jan **10**;

Molecular mechanism and functional role of brefeldin A-mediated ADP-ribosylation of CtBP1/BARS. Colanzi A, Grimaldi G, Catara G, Valente C, Cericola C, Liberali P, Ronci M, Lalioti VS, Bruno A, Beccari AR, Urbani A, De Flora A, Nardini M, Bolognesi M, Luini A, Corda D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 11; **110**(24):9794-9.

C6orf89 encodes three distinct HDAC enhancers that function in the nucleolus, the golgi and the midbody. Lalioti VS, Vergarajau-regui S, Villasante A, Pulido D, Sandoval IV. *J Cell Physiol*. 2013 Sep; **228**(9):1907-21.

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:
Ángel Bago Plaza
Beatriz Cardeñes Pérez
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. 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). Nuestros estudios muestran que, durante la interacción antígeno-específica entre ambos tipos celulares, eNOS se transloca, junto con el aparato de Golgi, a las proximidades de los contactos intercelulares, organizándose en las proximidades de un anillo periférico de actina desde donde regula la organización de receptores de señalización en la zona central de la sinapsis inmune y la ruta de señalización Ras-Raf-Mek-Erk. En la actualidad, nuestra investigación está dirigida a estudiar los mecanismos por los que el NO puede regular la organización y activación de moléculas de señalización en la sinapsis inmune, así como el papel que éstos pueden desempeñar en la diferenciación de los linfocitos T.

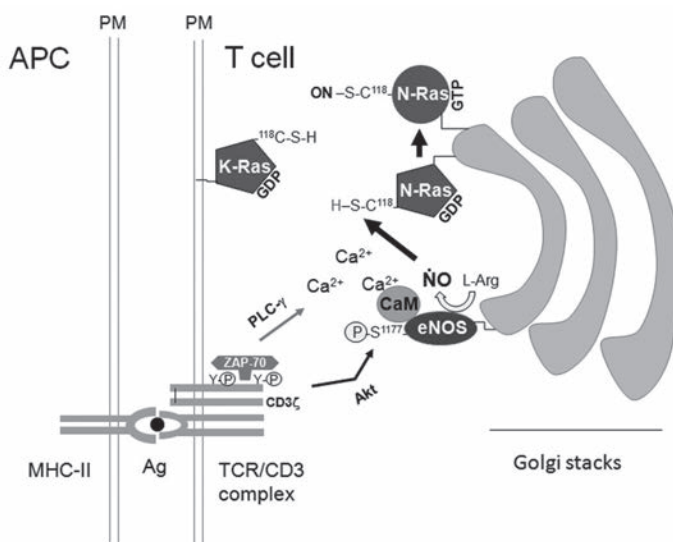


Figura 1. Mecanismo de activación compartimentalizada de N-Ras en células T. K-Ras se localiza en la membrana plasmática (PM) mientras que N-Ras se localiza principalmente en el Golgi, co-localizando con eNOS. Tras las interacciones antígeno (Ag)-específicas entre células T y células presentadora de Ag (APC), PLC-γ y Akt se activan en la células T a través del reclutamiento de la tirosina-quinasa ZAP-70 al complejo TCR. La activación de PLC-γ aumenta los niveles citoplasmáticos de inositol 1,4,5-trifosfato, liberando Ca²⁺ desde compartimentos internos, el cual se une al complejo calmodulina-eNOS. Por otra parte, Akt fosforila eNOS en la Ser1177, estimulándose en el Golgi la producción de NO y favoreciendo la activación selectiva de N-Ras a través de S-nitrosilación en la Cys118.

Figure 1. Compartmentalized S-nitrosylation of N-Ras but not K-Ras in antigen-stimulated T cells. K-Ras is targeted to the plasma membrane (PM) whereas N-Ras is mainly localized on the Golgi, co-localizing with eNOS. Upon TCR binding to antigen (Ag) on an antigen presenting cell (APC), the activation of PLC-γ and Akt is induced by recruitment of the tyrosine kinase ZAP-70 to the TCR complex. PLC-γ increases the cytosolic levels of inositol 1,4,5-triphosphate, releasing Ca²⁺ from internal stores, which bind to calmodulin-associated eNOS. On the other hand, Akt can phosphorylate eNOS on Ser1177. As result of the combined actions of Ca²⁺ and phosphorylation, eNOS is induced to produce NO on the Golgi, fostering N-Ras selective activation by S-nitrosylation on Cys118.

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. 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 (IS), a specialized intercellular structure involved in the regulation of TCR signalling. We have found that during antigen-specific T cell-APC interactions, Golgi-associated eNOS translocates to cell-cell contacts and organizes near a peripheral ring of actin, regulating the assembling of receptors at the central area of the IS and Ras-Raf-Mek-Erk signalling from the Golgi apparatus. Currently, the scientific priority of our studies is to explore the mechanisms by which NO regulate the organization of signalling molecules at the IS and whether those mechanisms may play a major role in T cell differentiation.

Publicaciones / Publications

Hersanz-Agustín, P., Izquierdo-Álvarez, A., García-Ortiz, A., Ibiza, S., Serrador, J.M., and Martínez-Ruiz, A. (2013) Nitrosothiols in the immune system: signalling and protection. *Antioxid. Redox. Sign.* **18**, 288-308.

Martínez-Ruiz, A., Araujo, I.M., Izquierdo-Alvarez, A., Hermansanz-Agustín, P., Lamas, S., and Serrador, J.M. (2013). Specificity in S-nitrosylation: A short-range mechanism for NO signaling? *Antioxid. Redox. Sign.* **19**, 1220-1235.

Desarrollo del sistema linfohematopoyético humano

Development of the human lymphohematopoietic system



Jefe de Línea / *Group Leader:*
María L. Toribio García

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

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

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Juan Alcain Sánchez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Mercedes Pérez Olivares
Isabel Córdoba Mora
Pablo Hernández Malmierca
Víctor Toribio Serrano
Daniel Fernández

Resumen de investigación

Nuestro grupo estudia los mecanismos que determinan la generación de linajes celulares concretos a partir de las células madre y los progenitores hematopoyéticos (HSC/HPCs) humanos. En particular, queremos entender cómo se regula el desarrollo fisiológico de los linfocitos T para poder identificar las vías cuya desregulación es crucial en la inducción de patologías como la leucemia linfoblástica aguda T (T-ALL). El objetivo final es trasladar este conocimiento al diseño de estrategias terapéuticas frente a dianas moleculares específicas, y obtener la prueba de concepto en modelos experimentales preclínicos para su posterior traslación a la clínica.

Utilizando aproximaciones genéticas de pérdida y ganancia de función, ensayos de diferenciación celular *in vitro* y modelos de hematopoyesis en ratones humanizados, hemos caracterizado la participación de los receptores Notch1 en el desarrollo fisiológico y patológico de los linfocitos T humanos. Además, hemos estudiado la regulación espacio-temporal de los diferentes ligandos de Notch en distintos microambientes tímicos, y estamos definiendo su implicación en la especificación diferencial de los diversos tipos celulares intratímicos, incluyendo subtipos de células T como las células T reguladoras, y células no-T como las células dendríticas y los macrófagos. Asimismo, hemos identificado dos nuevas dianas transcripcionales de Notch1: el receptor para interleuquina-7 (IL-7R) y la molécula de adhesión CD44, cuya participación en la generación y progresión de la T-ALL está siendo investigada en la actualidad.

Más recientemente, nuestro interés se ha extendido al estudio de la involución tímica que acontece como consecuencia del envejecimiento, y estamos analizando las bases moleculares de este proceso en el contexto del proyecto THY-MISTEM financiado por el 7FP de la Unión Europea. Perseguimos la identificación de las células madre del epitelio tímico y su caracterización funcional, con el fin de diseñar estrategias para su utilización en futuras terapias regenerativas dirigidas a la recuperación de la función de los linfocitos T en sujetos mayores que sufren inmunosenescencia.

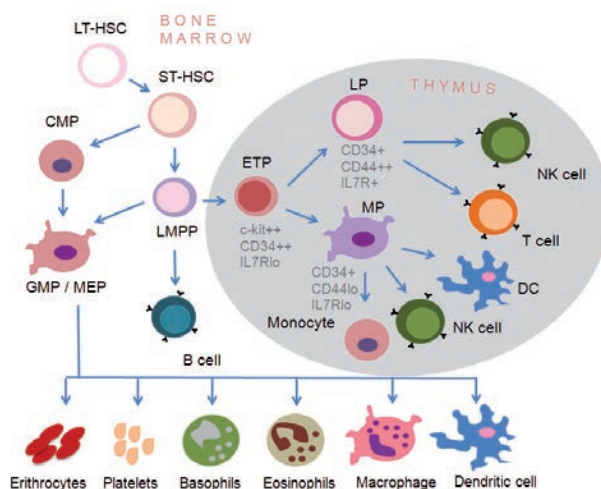


Figura 1. Modelo de diferenciación hematopoyética.

Figure 1. Hematopoietic differentiation model.

Research summary

Our group studies the mechanisms underlying the generation of specific cell lineages from hematopoietic stem and progenitor cells (HSC/HPCs) in humans. In particular, our aim is to understand how physiological development of T cells is regulated, in order to identify the deregulated pathways involved in the induction of pathologies such as acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). The ultimate goal is to transfer this knowledge to the design of therapeutic strategies against specific molecular targets, and to obtain proof of concept in preclinical experimental models for later translation to the clinic.

Using loss and gain of function genetic approaches, in vitro cell differentiation assays and humanized mouse models, we have characterized the specific role of the Notch1 pathway at discrete stages of physiological and pathological human T lymphocyte development. Furthermore, we have analyzed the spatiotemporal regulation of different Notch ligands in different thymic microenvironments, and we are defining their involvement in the differential specification of various intrathymic cell types, including T cell subtypes such as regulatory T cells, and non-T cells as dendritic cells and macrophages. We have also identified two novel transcriptional targets of Notch1: the receptor for interleukin-7 (IL-7R) and the adhesion molecule CD44, whose participation in the generation and progression of T-ALL is being investigated at present.

More recently, our interest has been extended to the study of thymic involution that occurs as a result of aging, and we are analyzing the molecular basis of this process in the context of a project funded by the European Union 7FP (THYMISTEM). Our aim is the identification and functional characterization of thymic epithelial stem cells, in order to design strategies for their future use in regenerative therapies directed to the recovery of T-cell function in aged subjects suffering immunosenescence.

Publicaciones / Publications

Domínguez-Soto A., de las Casas-Engel M., Bragado R., Medina-Echeverz J., Aragonese-Fenoll L., Martín-Gayo E., van Rooijen N., Berraondo P., Toribio ML., Moro MA., Cuartero I., Castrillo A., Sanchó D., Sánchez-Torres C., Bruhns P., Sánchez-Ramón S., Corbí AL. (2014) Intravenous immunoglobulin promotes antitumor responses by modulating macrophage polarization. *J Immunol.* **193**(10), 5181-5189.

Cortés JR., Sánchez-Díaz R., Bovolenta ER., Barreiro O., Lasarte S., Matesanz-Marín A., Toribio ML., Sánchez-Madrid F., Martín P. (2014) Maintenance of immune tolerance by Foxp3(+) regulatory T cells requires CD69 expression. *J Autoimmun.* **55**, 51-62.

Galletto R., Lebuhotel C., Poirot L., Gouble A., Toribio ML., Smith J., Scharenberg A. (2014) Pre-TCRalpha supports CD3-dependent reactivation and expansion of TCRalpha-deficient primary human T-cells. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development.* **1**:14021.

Rubio R., Gutierrez-Aranda I., Sáez-Castillo AI., Labarga A., Rosu-Myles M., Gonzalez-Garcia S., Toribio ML., Menendez P., Rodriguez R. (2013) The differentiation stage of p53-Rb-deficient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development. *Oncogene.* **32**(41), 4970-4980.

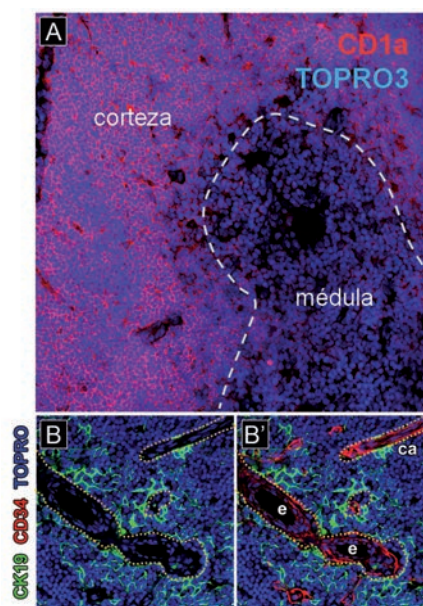
Patentes / Patents

María Luisa Toribio, Marina García Peydró y Francisco Sánchez Madrid. "Aplicación terapéutica de agentes inhibidores de CD44 frente a la leucemia linfoblástica aguda (ALL) humana". N. de solicitud: PCT/ES2013/070576.

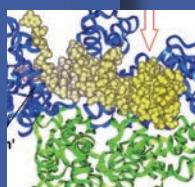
María Luisa Toribio, Marina García Peydró, Sara González García, Patricia Fuentes y Juan Alcain. "Tratamiento terapéutico de leucemias linfoblásticas agudas T y B y linfomas humanos por inhibición del receptor de interleuquina-7 (IL-7R)". N. de solicitud: PCT/ES2013/070923.

Figura 2. A) Expresión del marcador CD1a en el timo humano. B y B') Caracterización inmunohistoquímica del espacio perivascular (PVS) del timo humano. CK19: Citoqueratina 19. e: endotelio. ca: endotelio capilar.

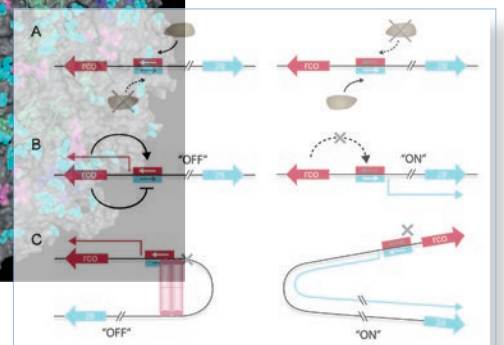
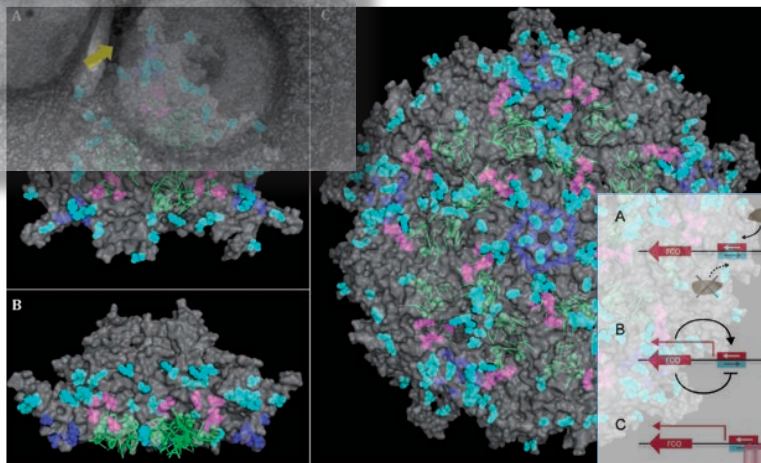
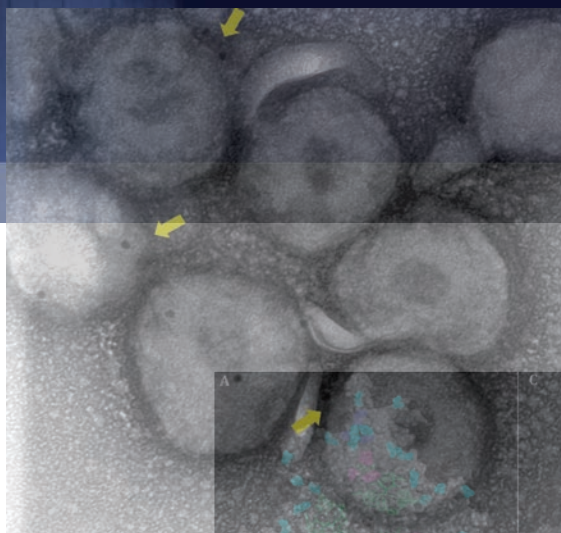
Figure 2. A) CD1a marker expression in the human thymus. B and B') Immunohistochemical characterization of the perivascular space (PVS) in the human thymus. CK19: Cytokeratin 19. e: endothelium. ca: capillary endothelium.



- 62 Modulación de la respuesta inmune por virus
Viral modulation of the immune response
ANTONIO ALCAMÍ PERTEJO
- 64 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
- 66 Ecología Molecular de Ambientes Extremos
Molecular Ecology of Extreme Environments
RICARDO AMILS PIBERNAT
- 68 División celular bacteriana y resistencia a antibióticos
Bacterial cell division and antibiotics resistance
JUAN ALFONSO AYALA SERRANO
- 70 Biotecnología y genética de bacterias termófilas extremas
Biotechnology and genetics of extreme thermophilic bacteria
JOSÉ BERENGUER CARLOS
- 72 Variabilidad genética de virus RNA
Genetic variability of RNA viruses
ESTEBAN DOMINGO SOLANS
- 74 Bioingeniería de enzimas de levaduras para generar compuestos bioactivos
Yeast enzymes bioengineering to generate bioactive compounds
MARÍA FERNÁNDEZ LOBATO
- 76 Ingeniería de Virus y Nanobiotecnología
Virus Engineering and Nanobiotechnology
MAURICIO GARCÍA MATEU
- 78 Grupo de Modelado Molecular
Molecular Modelling Group
PAULINO GÓMEZ-PUERTAS
- 80 Desarrollo de herramientas genéticas para la manipulación de bacterias Gram+ a partir de la caracterización molecular de un plásmido de *Bacillus*
Developing genetic tools to modify clinically and industrially relevant Gram+ bacteria by exploring transfer and other functions of a Bacillus plasmid
WILFRIED J. J. MEIJER
- 82 Retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana y terapia antirretroviral
Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and antiretroviral therapy
LUIS MENÉNDEZ ARIAS
- 84 Mecanismos moleculares de interacción virus-célula: el modelo del virus de la peste porcina africana
Virus Cell Interaction. The ASFV Model
YOLANDA REVILLA NOVELLA
- 86 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
- 88 Estructura del mRNA y control traduccional en sistemas biológicos
mRNA structure and translational control in biological systems
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
Soledad Blanco Chapinal
Juan Alonso Lobo
Leyre Mestre
Daniel Aguirre de Carcer
Bruno Hernáez
Alberto Rastrojo

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:
Nadia Martínez Martín
Carla Mavian
Haleh Heidarieh
Graciela Alonso
Alberto López Muñoz
Marcos Parras Moltó

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:

Rocío Martín Hernández
Carolina Sánchez Fernández
María del Carmen Fernández

Estudiantes /

Undergraduate Students:
Patricia Suárez Moltó
Ana Rodríguez Galet
Elena Priego

Científicos visitantes /
Visiting scientists:

Antonio Quesada
(Departamento Biología, Universidad
Autónoma de Madrid)
Vicente Pérez Brocal
(Fundación para el Fomento de la
Investigación Sanitaria y Biomédica
de la Comunidad Valenciana)

Resumen de investigación

Estamos interesados en entender los mecanismos de patogénesis viral y las estrategias utilizadas por virus DNA de gran tamaño (poxvirus y herpesvirus) para evadir la respuesta inmune del hospedador. Trabajamos en el virus herpes simplex, un patógeno humano de relevancia clínica, y en algunos poxvirus como el virus ectromelia, un patógeno de ratón, y el virus vaccinia, la vacuna de la viruela. Hemos encontrado que estos virus codifican proteínas que se secretan de la célula infectada e interaccionan con citoquinas o quimioquinas. Estas proteínas virales funcionan como receptores que bloquean la actividad de las citoquinas y la respuesta inmune anti-viral, y pueden representar nuevos medicamentos anti-inflamatorios para tratar alergias y enfermedades inmunes en el hombre. Por el contrario, la glicoproteína G del virus herpes simplex tiene propiedades inesperadas que potencian la actividad de las quimioquinas. La contribución de los receptores de citoquinas virales a la patogénesis y modulación inmune está siendo estudiada en ratones infectados con el virus ectromelia, un patógeno natural del ratón que causa una enfermedad parecida a la viruela en el hombre y conocida como mousepox.

Estamos utilizando técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) para secuenciar el genoma de virus DNA de gran tamaño con el propósito de identificar nuevos genes virales implicados en patogénesis y modulación inmune, incluyendo aislados naturales del virus ectromelia y herpesvirus asociados a patologías humanas (esclerosis múltiple). La metagenómica está cambiando nuestra forma de ver el mundo de los virus mediante el descubrimiento de nuevos virus y la caracterización genética completa de comunidades virales. Estamos llevando a cabo estudios de metagenómica de virus para caracterizar comunidades complejas de virus en diferentes ambientes naturales extremos (lagos, sedimento, tapetes microbianos y aguas termales) de la Antártida, Ártico (Svalbard) y Patagonia chilena. Nuestro laboratorio también incluye al Dr. Alberto López Bueno, un investigador financiado por el Programa Ramón y Cajal, que lleva a cabo un proyecto independiente para caracterizar a través de metagenómica la comunidad de virus asociada a patologías humanas de la cavidad oral.

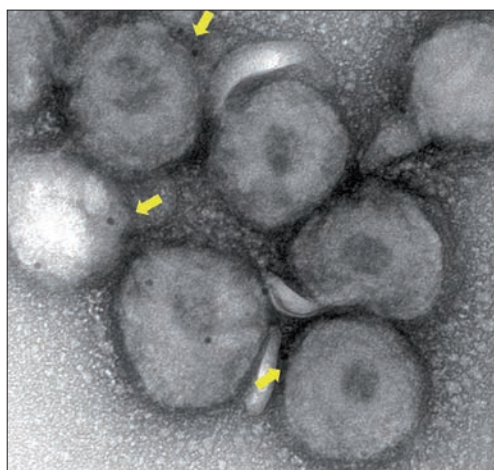


Figura 1. Detección por microscopía electrónica de la quimioquina CXCL12 unida a la proteína de unión a quimioquinas gG en la superficie de partículas del virus herpes simplex-1.

Figure 1. Detection by electron microscopy of the chemokine CXCL12 attached to the chemokine binding protein gG at the surface of herpes simplex virus-1 particles.

Research summary

We are interested in understanding the mechanisms of viral pathogenesis and the strategies used by large DNA viruses (poxviruses and herpesviruses) to evade the host immune response. We work on herpes simplex virus, a human pathogen of clinical relevance, and several poxviruses such as ectromelia virus, a mouse pathogen, and vaccinia virus, the smallpox vaccine. We found that these viruses encode proteins that are secreted from the infected cell and interact with cytokines or chemokines. These viral proteins function as decoy receptors blocking the activity of cytokines and the anti-viral immune response, and may represent novel anti-inflammatory medicaments to treat human allergic and autoimmune diseases. By contrast, glycoprotein G from herpes simplex virus has unexpected properties enhancing chemokine activity. 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.

We are using next generation sequencing (NGS) technologies to sequence the genome of large DNA viruses with the purpose of identifying new viral genes involved in pathogenesis and immune modulation, including natural isolates of ectromelia virus and herpesviruses associated with human pathologies (multiple sclerosis). Metagenomics is changing our perspective of the virus world by uncovering new viruses and allowing the genetic characterization of complete viral communities. We are engaged in viral metagenomic studies to characterize complex viral communities in different natural environments under extreme conditions (freshwater lakes, sediments, microbial mats and hot springs) from Antarctica, the Arctic (Svalbard) and Patagonia (Chile). Our laboratory also hosts Dr. Alberto López Bueno, a researcher funded by the Ramón y Cajal Programme, who undertakes an independent project to characterize through metagenomics the viral community associated with pathologies of the human oral cavity.

Publicaciones / Publications

Pontejo, S. M., Sánchez, C., Martín, R., Mulero, V., Alcamí, A. and Alejo, A. (2013) An orphan viral TNF receptor superfamily member identified in Lymphocystis disease virus. *Virology J.* **10**:188 doi: 10.1186/1743-422X-10-188.

Rubio, D., Xu, R.-H., Krouse, T. E., Truckenmiller, M. E., Mathis, S., Alcamí, A., Norbury, C. C. and Sigal, J. L. (2013) Cross talk between the Type I interferon and Nuclear Factor Kappa B pathways rescues resistance to a viral disease. *Cell Host Microbe* **13**, 701-710.

Mavian, C., López-Bueno, A. and Alcamí, A. (2014) Genome sequence of WAU86/88-1, a new variant of vaccinia virus Lister strain from Poland. *Genome Announc.* **2**(1). pii: e01086-13.

Fernández-Arenas, E., Calleja, E., Martínez-Martín, N., Gharbi, S. I., Navajas, R., García-Medel, N., Penela, P., Alcamí, A., Mayor Jr, F., Albar, J. P. and Alarcón, B. (2014) β -arrestin-1 mediates the TCR-triggered re-routing of distal receptors to the immunological synapse by a PKC-mediated mechanism. *EMBO J.* **33**, 559-577.

Santpere, G., Darre, F., Blanco, S., Alcamí, A., Villoslada, P., Albà, M. M. and Navarro, A. (2014) Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1000 Genomes Project. *Genome Biol. Evol.* **6**, 846-860.

Mavian, C., López-Bueno, A., Bryant, N. A., Seeger, K., Quail, M. A., Harris, D., Barrell, B. and Alcamí, A. (2014) The Genome Sequence of Ectromelia Virus Naval and Cornell Isolates from Outbreaks in North America. *Virology* **462**-463:218-226.

Aguirre de Cárcer, D., Angly, F. E. and Alcamí, A. (2014) Evaluation of viral genome assembly and diversity estimation in deep metagenomes. *BMC Genomics* **15**:989.

Parras-Moltó, M., Suárez-Rodríguez, P., Eguía, A., Aguirre-Uribe, J. M. and López-Bueno, A. (2014) Genome sequence of two novel species of torque teno minivirus from the human oral cavity. *Genome Announc.* **2**(5). pii: e00868-14.

Patentes / Patents

Martín-Pontejo, S. y Alcamí, A. GAG binding of poxvirus-encoded proteins with a SECRET domain. Número de prioridad: PCT International Patent Application PCT/ES2013/070232. País: International. Fechas de prioridad: 11 abril 2013. Propietario: S. Martín-Pontejo y A. Alcamí.

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.

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/).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Carla Mavian (2013). Secuenciación del genoma de nueve aislados del virus ectromelia: implicaciones evolutivas y determinantes de virulencia. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Alberto López-Bueno y Antonio Alcamí.



Figura 2. Muestreando lagos congelados en la Península de Byers (Isla Livingston, Antártida) para estudiar la comunidad de virus en este ambiente extremo.

Figure 2. Sampling of frozen lakes in Byers Peninsula (Livingston Island, Antarctica) to study the viral community in this extreme environment.

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

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows: Jon Gil-Ranedo

Becarios Predoctorales / Graduate Students: Nooshin Bayat

Técnicos de Investigación / Technical Assistance: Josefa González-Nicolás

Estudiantes / Students: Aroa Tato, Marta Pérez, Carlos Gallego, Carlos Domínguez

Científicos Visitantes / Visiting Scientists: Rafael Wolfisberg (Berna/Bern)

Resumen de investigación

El laboratorio utiliza el parvovirus diminuto del ratón (MVM) como modelo principal, aunque no único, para investigar los mecanismos moleculares que gobiernan las interacciones de los Parvovirus con (i) células de cáncer humano y con (ii) sus hospedadores naturales. (i) Entre los factores implicados en el tropismo privilegiado de estos virus por células transformadas, se encuentra la actividad de la kinasa Raf-1 de la ruta MAPK, que es crucial para el ensamblaje nuclear de la cápsida. Hemos encontrado que esta actividad explica (al menos en parte) la dependencia de la multiplicación de los parvovirus por el ciclo celular. Entre los mecanismos implicados en la infección de distintos tipos de células, hemos profundizado en el papel crucial que desempeña un pequeño segmento desordenado de la cápsida del MVM (Figura 1), que ha de ser expuesto en la superficie y cortado dentro de la célula para que la infección productiva pueda comenzar. (ii) Hemos continuado el análisis de los parámetros genéticos y estructurales que rigen la evolución del MVM *in vivo* bajo distintas presiones selectivas, lo que sigue confirmando la extraordinaria plasticidad de este virus para acomodar cambios estructurales que le permitan soportar o evadir presiones de distinto signo.

Estamos extendiendo recientemente estas aproximaciones a otros miembros de los *Parvoviridae*, con la idea de ampliar y mejorar nuestra visión de esta familia. En su conjunto, nuestros estudios ilustran como debido a su pequeño genoma, estos virus requieren múltiples funciones celulares para su propagación exitosa en la naturaleza, lo que complica su comprensión pero enriquece su biología.

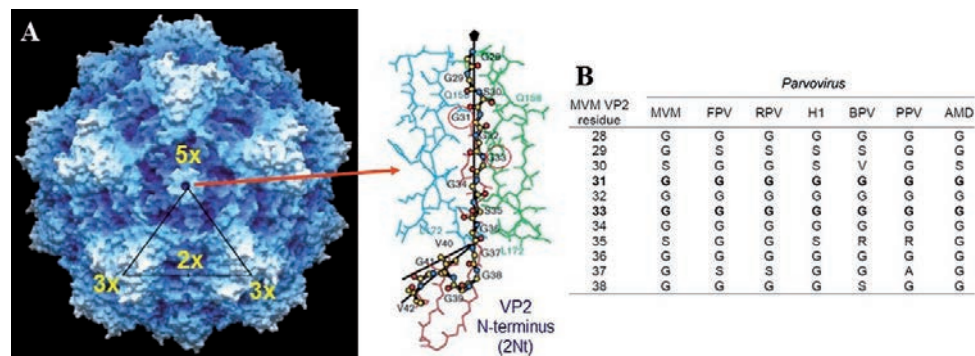


Figura 1. Exposición del segmento rico en glicinas de la VP2 de la cápsida del MVM durante la infección. (A) Estructura tridimensional de la cápsida icosaédrica del MVM en la que se ilustra la disposición a través del poro (eje de orden 5) de la secuencia rica en glicinas del extremo amino de VP2. Los residuos de glicina G31 y G33 marcados con círculos fueron mutagenizados para su análisis funcional. La exposición intracelular y el corte de este segmento fueron necesarios para iniciar la infección. (B). Conservación de este segmento de glicinas en distintos parvovirus.

Figure 1. Exposure of the VP2 glycine-rich segment of the MVM capsid during infection. (A) Tridimensional structure of the MVM icosahedral capsid showing the allocation through the pore (five fold axis) of the glycine-rich sequence of VP2 n-terminus. The G31 and G33 encircled glycine residues were mutagenized for functional analysis. The intracellular exposure and cleavage of this segment were found necessary to initiate infection. (B) Conservation of this glycines segment in different parvoviruses.

Research summary

The laboratory uses the parvovirus minute virus of mice (MVM) as a main, although not only, model to investigate the molecular mechanisms governing the interactions of Parvoviruses with (i) human cancer cells and (ii) natural hosts. (i) Among those factors implicated in the privileged tropism of these viruses toward transformed cells, the activity of the Raf-1 kinase of the MAPK route was found to be crucial for nuclear capsid assembly. We have found that this activity explains (at least in part) the dependence of parvovirus multiplication for the cell cycle. Within other mechanisms implicated in the infection of different cell types, we deeped into the crucial role that a small unordered segment of the MVM capsid plays (Figure 1), which must be exposed onto the surface and cleaved within the cell to onset the productive infection. (ii) We have pursued the analysis of genetic and structural parameters governing MVM evolution in vivo under different selective pressures, what keeps on confirming the extraordinary plasticity of this virus to accomodate structural changes allowing to withstand or to evade them.

We are recently extending these approaches to other members of the Parvoviridae to gain a wider and improved view of this family. In summary, our studies illustrate that because of their small genome, these viruses require multiple cellular functions to be successfully propagated in nature, what do complicate their understanding but enrich their biology.

Publicaciones / Publications

Castellanos, M., Pérez, R., Rodríguez-Huete, A., Grueso, E., Almendral, J.M*, and Mateu, M.G*. (2013). A slender tract of glycines is required for translocation of protein VP2 N-terminal domain through the parvovirus MVM capsid channel to initiate infection. *Biochemical Journal*, **455**, 87–94.

Mendiburu-Eliçabe, M*, Gil-Ranedo, J*. and Izquierdo, M. (2013). Efficacy of Rapamycin against glioblastoma cancer stem cells. *Clinical and Translational Oncology* (2013).

Almendral, J.M. (2013) Assembly of simple icosahedral viruses. *Sub-cellular Biochemistry*. Vol. 68: 307-328.

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

Kary G.Haro Pérez
Tania Leandro
Cristina Escudero
José Jordán

Técnicos de Investigación / Technical Assistance:
Nuria Rodríguez González
Catalina del Moral Juárez
Diego Carrillo

Científicos Visitantes / Visiting Scientists:
Alberto González Fairen
(NASA-Ames, USA)
Eric Zettler
(MBL, Woods Hole, USA)

Resumen de investigación

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

- Geomicrobiología del subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica (IPB): caracterización del bio-reactor subterráneo en la IPB responsable de las condiciones extremas de la cuenca del Tinto. Este trabajo se está desarrollando en colaboración con el grupo del profesor J.L. Sanz del Departamento de Biología Molecular (UAM) y el Centro de Astrobiología (Proyecto ERC-IPBSL).
- Caracterización geomicrobiológica de ambientes extremos como modelos astrobiológicos de habitabilidad: la cuenca del Tinto (análogo de Marte), depósitos de sulfuros metálicos de la Antártica (análogo de Marte), la laguna hipersalina de Tirez (análogo de Europa), el salar de Uyuni (análogo de Europa). Los ambientes hipersalinos se están caracterizando en colaboración con la profesora I. Marín del Departamento de Biología Molecular de la UAM.
- 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, distintas lagunas ácidas de la Faja Pirítica Ibérica y la Antártida).

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.

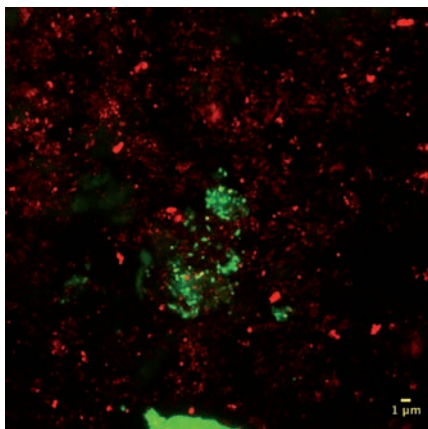


Figura 1. Identificación por CARD-FISH de *Acidithiobacillus* a -430m.

Figure 1. Acidithiobacillus identification by CARD-FISH at -430m.



Figura 2. Toma de muestras en el Salar de Uyuni, Bolivia.

Figure 2. Sampling in the Salar de Uyuni, Bolivia.

Research summary

- *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 group of professor J.L. Sanz from the Molecular Biology Department (UAM) and the Centro de Astrobiología (ERC Project IPBSL)*

- *Geomicrobiological characterization of extreme environments as habitability models: Tinto basin (Mars analogue), sulfide deposits from Antartica (Mars analogue), Tirez hypersaline lagoon (Europa analogue), Uyuni salt lake (Europa analogue). The hyperhalophilic environments are characterized in collaboration with professor I. Marín from the Department of Molecular Biology (UAM).*

- *Acidophiles: conventional microbial ecology, molecular ecology, molecular biology and biotechnology (control of bioleaching, specific metal sequestering and phytoremediation) of extreme acidic environments (Río Tinto basin, different acidic lakes of the Iberian Pyritic Belt, Antartica),*

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.*

Publicaciones / Publications

de la Fuente, V., Oggerin, M., Rufo, L., Rodríguez, N., Ortúñez, E., Sánchez-Mata, D., Amils, R. (2013). *Plant Biosystems*, **147** : 158-173.

Malki, M., Casado, S., López, M.F., Caillard, R., Palomares, F.J., Martín Gago, J.A., Vaz-Domínguez, C., Cuesta, A., Amils, R., Fernández, V.M., Velez, M., DE Lacey, A.L., Olea, D. (2013). *ChemPhysChem*, **14**: 1237-1244.

Servín-Garcidueñas, L.E., Garret, R.A., Amils, R., Martínez-Romero, E. (2013). *Genome A*, vol 1, issue 1 e00041-12

Marteinsson, V., Vaishampayan, P., Kvidero, J., Mapelli, F., Medori, M., Calfapietra, C., Aguilera, A., Hamisch, D., Reynisson, F., Magnússon, S., Marasco, R., Borin, S., Calzada-Díaz, Souza-Egipsy, V., González-Toril, E., Amils, R., Elster, J., Hänsch, R. (2013). *Life*, **3**: 211-233.

Oggerin M, Tornos, F., Rodríguez, N., del Moral, C., Sánchez-Román, M., Amils, R. (2013). *Environ. Microbiol.*, **15**(8): 2228-2237.

Franco, A., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., De la Fuente, V. (2013) *J of Plant Nutrition & Soil Sciences*, **178**: 836-842,

Sánchez-Andrea, I., Stams, A., Amils, R., Sanz, J.L. (2013). *Environ. Microbiol. Rev.* **5**: 672-678.

Santofimia, E., González-Toril, E., López-Pamo, E., Amils, R., Aguilera, A. (2013). *PlosOne*, Vol 8, issue 6 e66746.

Dold, B., González-Toril, E., Aguilera, A., López-Pamo, E., Cisternas, M.E., Bucci, F., Amils, R. (2013). *Environ. Science & Technol.* **47**: 6129-6136.

González-Toril E., Santofimia E., López-Pamo E., Omeregí E.O., Amils R., Aguilera A. (2013). *Advanced Materials Research*, **825**: 23-27.

Amils R., Fernández-Remolar D., Parro V., Rodríguez-Manfredi J.A., Timmis K., Oggerin M., Sánchez-Román M., López F.J., Fernández J.P., Puente F., Gómez-Ortiz D., Briones C., Gómez F., Omeregí E., García M., Rodríguez N., Sanz J.L. and the IPBSL Team (2013). *Advanced Materials Research*, **825**: 15-18.

Creveling J.R., Fernández-Remolar D., Rodríguez-Martínez M., Menéndez S., Bergmann K.D., Gil B.C., Abelson J., Amils R., Ehlmann B.L., García Bellido D.C., Grotzinger J.P., Hallmann C., Stack, K.M., Knoll A.H. (2013). *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleocology*, **386**: 459-478.

Montoya, L., Vizioli, C., Rodríguez, N., Rastoll, M.J., Amils, R., Marín, I. (2013). *Aquatic Biosystems*, **9**: 19, doi: 10.1186/2046-9063-9-19.

Sánchez-Mata D., de la Fuente V., Rufo L., Rodríguez N., Amils R. (2013). *Biological Trace Elements Research*. 12/2013, doi: 10.1007/s12011-013-9869-4.

Sánchez-Mata D., de la Fuente V., Rufo L., Rodríguez N., Amils R. (2013). *Lazarro* **34**, 275-283.

González-Ramírez, D.F., Muro-Urista, C.R., Arana-Cuenca, A., Téllez-Jurado, A., González Becerra, A.E. (2014). *Biología* **69**/11:1464-14, doi: 10.2478/s11756-041-0453-x.

Mandujano-González, V., Arana-Cuenca, A., Anducho Reyes, M.A., Téllez-Jurado, A., González-Becerra, A.E., Mercado-Flores, Y. (2013). *Protein Expression and Purification* **92**:214-222.

Laluzza J., Puig R., Rius A., Martí E., Martí J.F., Rodríguez N., Amils R. (2014). *Journal of the American Leather and Chemist Association (JALCA)*, **109**(1): 14-24.

Puente-Sánchez F., Moreno-Paz M., Rivas, L., Cruz-Gil P., García-Villadangos M., Gómez M. J., Postigo M., Garrido P., González-Toril E., Briones C., Fernández-Remolar D., Stoker C., Amils R., Parro V. (2014). *Geobiology*, **12**, 34-47.

San Martín-Uriz P., Mireete S., Alcolea P.J., Gómez M.J., Amils R., González-Pastor J.E. (2014). *PM. PlosOne*. 9(4):e95041.

Gómez-Ortiz D., Fernández-Remolar D., Granda A., Quesada C., Granda T., Prieto-Ballesteros O., Molina A., Amils R. (2014). *Earth and Planetary Science Letters*, **391**: 36-41.

Gómez-Gómez J.M., Amils R. (2014). *BMC, Research Notes*, **7**: 108, <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/7/108>.

Sánchez-Román, M., Fernández-Remolar, D., Amils, R., Sánchez-Navas, A., Schmid, T., San Martín-Uriz, P., Rodríguez, N., McKenzie, J.A., Vasconcelos, C. (2014). *Scientific Reports*, **4**: 4767, doi: 10.1038/srep04767.

Oggerin, M., Rodríguez, N., del Moral, C., Amils, R. (2014). *Res. Microbiol.*, **165**, 719-725.

Puente-Sánchez, F., Sánchez-Román, M., Amils, R., Parro, V. (2014) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 3546-3552.

Gómez-Gómez, J.M., Amils R. (2014). *Advance in Bioscience and Biotechnology*, **5**, 727-739.

Gómez-Ortiz, D., Fernández-Remolar, D., Granda, A., Quesada, C., Granda, T., Prieto-Ballesteros, O., Molina, A., Amils, R. (2014). *Earth and Planetary Science Letters* **403**, 459-462.

Amils, R., Fernández-Remolar, D. and the IPBSL team (2014). *Life* **4**, 511-534.

Biotechnología y medio Ambiente (Marín, I., Sanz, J.L., Amils, R eds), 2ª edición, editorial Ephimera (Alcalá de Henares).

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
Contratado Proyecto DIVINOCELL(EU)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Cristian Gustavo Aguilera Rossi
(Becario Predoctoral)
Alaa Ropy Mahmoud Sayed
(Becario JaePredoc)

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Laura Vila Díez (BioExpAv2)
Universidad Autónoma de Madrid.
Tobías Gundolf (ERASMUS)
Universität Wien, Dept. für Biochemie
und Zellbiologie, Austria.

Científicos visitantes /
Visiting Scientist:
Lina Johanna Zarate Bonilla
(Corporación CorpoGen, Bogotá,
Colombia)

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 están siendo de ayuda sustancial para comprender mejor cuestiones fundamentales sobre la capacidad de adaptación del peptidoglicano frente a los retos medioambientales. El grupo mantiene un número significativo de 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.

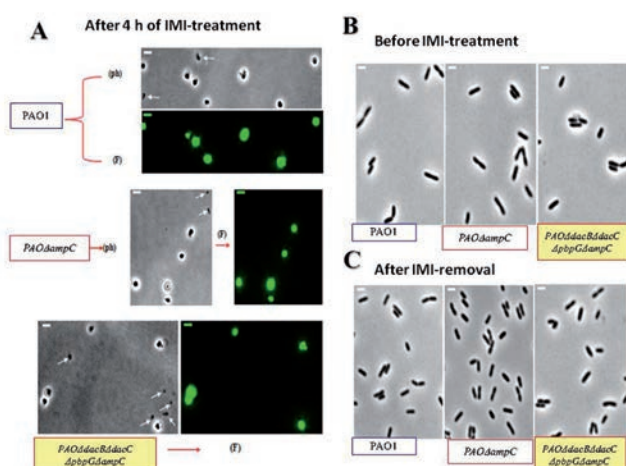


Figura 1. Esferoplastos inducidos por el tratamiento con imipenem de *Pseudomonas aeruginosa*.

Imágenes microscópicas de contraste de fase (ph) y la fluorescencia con CYTO 9 (F); IMI: imipenem. Los esferoplastos se obtuvieron después de la incubación de PAO1 cepa silvestre, y los mutantes PAOΔampC y PAOΔdacBΔdacCΔpbpGΔampC con 5x MIC de imipenem (+IMI) en medio CAMHB suplementado con 0,5 M de sacarosa durante 4 horas a 37°C sin agitación. El patrón de cambios en la morfología y estructura de PG fueron equivalentes en PAO y PAOΔdacBΔdacCΔpbpGΔampC, indicando que no hay funcionalidad para las LMM-PBP en el mecanismo de producción de células redondas.

Figure 1. Spheroplast induced by imipenem treatment of *Pseudomonas aeruginosa*.

Microscopic images of phase-contrast (ph) and fluorescence with CYTO 9 (F); IMI: imipenem. Spheroplasts were obtained after incubation of PAO1 wild type, PAOΔampC and PAOΔdacBΔdacCΔpbpGΔampC mutants with 5x MIC of imipenem (+IMI) in CAMHB media supplemented with 0.5 M sucrose for 4 hours at 37°C without agitation. The pattern of changes in morphology and PG structure were equivalent in PAO and PAOΔdacBΔdacCΔpbpGΔampC, indicating no role for the LMM-PBPs on the mechanism of production of round cell.

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 are been of substantial help to better understand fundamental questions about bacterial social behavior in polymicrobial 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 interdisciplinary effort including expertise areas as diverse as microbiology, crystallography, chemistry and bio-informatics.

Publicaciones / Publications

Di Conza, J. A., Badaracco, A., Ayala, J. A., Rodríguez, C., Famiglietta, A. and Gutkind, G. O., (2014) β -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant enterobacteria isolated in Buenos Aires, Argentina: A new *bla*TEM gene. *Rev. Argent. Microbiol.* **46**(3), 210-217.

Cambré, A., Zimmerman, M., Sauer, U., Vivij, B., Cenens, W., Michiels, C. W., Aertsen, A., Loessner, M. J., Noben, J. P., Ayala, J. A., Lavigne, R., and Briers, Y. (2014) Metabolite profiling and peptidoglycan analysis of transient cell wall-deficient bacteria in a new *Escherichia coli* model system. *Environ. Microbiol.* Aug 20.

Manzoor, S., Moncayo, S., Navarro-Villoslada, F., Ayala, J. A., Izquierdo-Hornillos, R., de Villena, F. J., and Caceres, J. O. (2014) Rapid identification and discrimination of bacterial strains by laser induced breakdown spectroscopy and neural networks. *Talanta* **121**, 65-70.

Hernández, S. B., Ayala, J. A., Rico-Pérez, G., García-del Portillo, F. and Casadesús, J. (2013) Increased bile resistance in *Salmonella* enterica mutants lacking Prc periplasmic protease. *International Microbiology* **16**(2), 87-92.

Cordeiro, N. F., Yim, L., Betancor, L., Cejas, D., García-Fulgueiras, V., Mota, M. I., Varela, G., Anzalone, L., Algorta, G., Gutkind, G., Ayala, J. A., Chabalgoity, J. A. and Vignoli R. (2013) Identification of the first *bla*CMY-2 gene in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolates obtained from cases of paediatric diarrhoea illness detected in South America. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **1**, 143-148.

Ellafi, A., Lagha, R., Haddeji, N., Bekir, K., González-Leiza, S. M., Ayala, J. A. and Bakhrouf, A. (2013) Variations in structural and plasmid profiles of starved *Shigella* in seawater. *African Journal of Microbiology Research* **7**(42), 4920-4926.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Alaa Ropy Mahmoud Sayed (2014). Functional characterization of AmpC β -lactamase and role of LMM-PBPs in peptidoglycan composition, β -lactam resistance and *ampC* regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Madrid. Director: Juan Alfonso Ayala Serrano, Profesor Honorario, Universidad Autónoma de Madrid. Calificación: SOBRESALIENTE "CUM LAUDE".

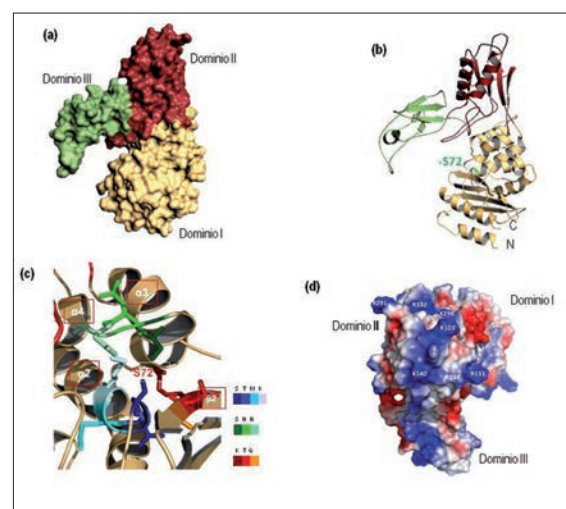


Figura 2. Modelo por homología para monómero de LMM-PBP4 en *Pseudomonas aeruginosa*.

(a) Modelado por homología para monómero de LMM-PBP4 en PAO1 (representación en superficie). Los diferentes dominios son presentados en color marrón (dominio I, PB), rojo (dominio II) y verde (dominio III). (b) Modelo tridimensional para LMM-PBP4 de PAO1 destacando la organización estructural secundaria mediante hélices α , láminas β y loops. Se indica en color verde la posición para el residuo S72 (serina catalítica) en el dominio I, además de los extremos amino y carboxilo terminal. (c) Dominio PB y motivos conservados en el sitio activo de LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1. (d) Potencial electrostático (rojo, carga negativa; azul, carga positiva) para LMM-PBP4 de PAO1, demostrando una superficie básica en el dominio II.

Figure 2. Homology model for LMM-PBP4 monomer in *Pseudomonas aeruginosa*.

(a) Modeling by homology for LMM-PBP4 monomer in PAO1 (surface rendering). The different domains are represented in brown (domain I, PB), red (domain II) and green (domain III). (b) Three-dimensional model for LMM-PBP4 of PAO1 highlighting the structural secondary organization by α helices, β sheets and loops. Residue position for S72 (catalytic serine) in domain I is highlighted in green and also the amino and carboxyl terminal are shown. (c) PB domain and conserved motifs in the active site of LMM-PBP4 of *Pseudomonas aeruginosa* O1. (d) Electrostatic potential (red, negative charge; blue, positive charge) for LMM-PBP4 of PAO1, showing a basic surface in domain II.

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:*
Ana Luisa Lopes Ribeiro

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Yamal Al-Ramahi González
Alba Blesa Esteban
Dione Sanchez Hevia
Manuel San Martín Fernández
de Heredia
Ángel Cantero Camacho
Mercedes Sánchez Costa

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Esther Sánchez Freire
María Luisa del Pozo Polo
Beatriz Praena García

Técnico de Gestión /
Project Manager:
Astrid Valencia Quiñones

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Joan Salvador Russo
Lara Pérez Sánchez
Cristina Cerdeño Guerra
Jorge Alvarez Alberca
Jorge Perez pastor

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Giusseppe Peruggino
Inmacolata Antonucci
Jesús Fernández-Lucas
Catarina Ferreira
Tanja Consolati
Gustavo J. Levin

Resumen de investigación

En nuestro laboratorio empleamos como modelo principal de trabajo a la bacteria termófila *Thermus thermophilus*, manipulable genéticamente, de filogenia ancestral y con aplicaciones muy relevantes en biotecnología y en Biología Estructural. Nuestro interés se centra tanto en aspectos básicos de su fisiología, como en aspectos aplicados. A nivel básico, estudiamos la respiración anaeróbica de óxidos de nitrógeno y las vías y barreras frente a su transferencia genética horizontal (HGT). En Biotecnología, empleamos sus enzimas en distintos proyectos, y la propia bacteria para la selección de variantes termoestables de otras enzimas. En los años 2013-2014 hemos acabado de caracterizar la nitrito y la óxido nítrico reductasas, y hemos estudiado los mecanismos que gobiernan su expresión regulada. El estudio de la HGT de este agrupamiento nos ha llevado a identificar un sistema similar a la conjugación que no implica homólogos de proteínas propias de la conjugación clásica, y a definir a un homólogo de la proteína Argonauta eucariótica (ttAgo) como elemento esencial en la discriminación entre DNA fiable, adquirido por conjugación, del DNA potencialmente peligroso encontrado en el medio y adquirido por transformación. En este sentido, es de destacar que ttAgo funciona por interferencia DNA-DNA y no RNA-RNA como ocurre en eucariotas.

En Biotecnología, nuestros esfuerzos se han concentrado en la selección de variantes termoestables de proteínas mediante la utilización de técnicas de interferencia de plegamiento basadas en la selección genética de resistencia a antibióticos, y en el desarrollo de nuevos vectores de selección basados en proteínas fluorescentes termoestables. En los próximos años profundizaremos en el estudio de la conjugación y en el papel discriminador ejercido por la proteína ttAgo y desarrollaremos proyectos de termoestabilización de enzimas basados en sistemas de selección *in vitro*, contando para ello con financiación nacional y europea.

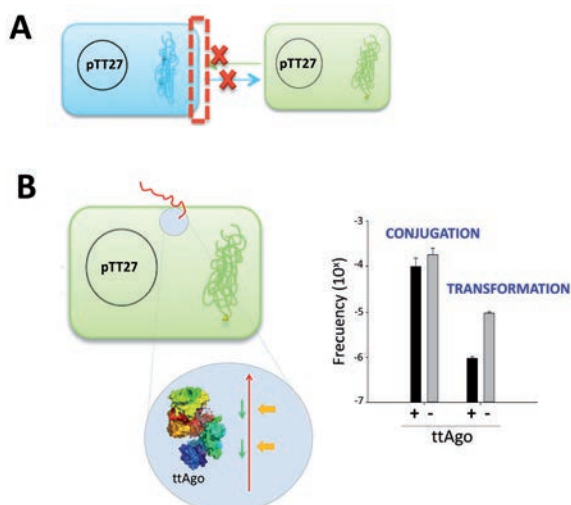


Figura 1. A) La conjugación en *Tth* implica dos sistemas independientes, uno de expulsión de DNA y el otro de entrada activa mediada por el sistema de competencia natural. Mutantes dobles en cada sistema (en azul) son incapaces de donar o recibir DNA a/desde una cepa silvestre (en verde). B) Más del 90% del DNA que entra por competencia natural es identificado y cortado por ttAgo empleando guías de DNA. El mismo DNA transferido por conjugación no dispara la respuesta de ttAgo.

Figure 1. A) Conjugation in *Tth* requires two independent systems, a pushing system DNA and a pulling one apparently identical to the natural competence. Double mutants in each of the system (in blue) are unable to receive or donate DNA from/to a wild type strain (in green). B) More than 90% of the DNA molecules that enter the cell by natural competence are targeted and cut by ttAgo using ssDNA guides. In contrast, ttAgo does not act when the same DNA transferred by conjugation.

Research summary

In our lab we use the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* as main model due to its amenability to genetic manipulation, its ancestral phylogeny, and its actual and potential applications in Biotechnology and Structural Biology projects. With this organism, our research interests focus on microbial physiology as well as biotechnological applications. At the physiology level, we study the last steps of anaerobic respiration of nitrogen oxides, and the pathways and barriers against its horizontal gene transfer (HGT). In a more applied line of research, we employ its enzymes for different purposes, and the bacteria itself as host for the selection of thermostable variants of relevant enzymes and proteins.

In 2013-2014 we characterized the thermostable nitrite and nitric oxide reductases from the denitrification pathway, finding as main goals multiple pathways for the first and a new subunit for the second. We have studied also the mechanisms that govern their regulated expression.

The analysis of the HGT has led us to identify a conjugation-like mechanism that does not involve homologues to components of classical conjugation systems. We also identified a thermophilic homologue of the Argonaute protein (ttAgo) as an essential element that allows discrimination between reliable DNA, acquired by conjugation, from potentially dangerous DNA acquired by transformation from the environment. In this regard, it is noteworthy that ttAgo works by DNA-DNA and not as RNA-RNA interference as it happens with eukaryotes.

In Biotechnology, our efforts have focused on the selection of thermostable variants of proteins by folding interference with thermostable antibiotic resistance as selection reporter, and in the development of new folding interference selection vectors based on thermostable fluorescent proteins.

In the years to come, we will further study the conjugation mechanisms and the discriminating role played by ttAgo, as well as develop in vitro thermostabilization platforms, funded by national and European projects.

Publicaciones / Publications

- Sandoval, M., Civera, C., Berenguer, J., García-Blanco, F., and Hernaiz, M.J. (2012) Optimised N-acetyl-D-lactosamine synthesis using *Thermus thermophilus* beta-galactosidase in bio-solvents. *Tetrahedron*. **69**, 1148-1152.
- Torres, L.L., Cantero, A., del Valle, M., Marina, A., López-Gallego, F., Guisán, J.M., Berenguer, and J., Hidalgo, A. (2013) Engineering the Substrate Specificity of a Thermophilic Penicillin Acylase from *Thermus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1555 -1562.
- Bayón, C., Cortés, A., Berenguer, J., and Hernáiz, M.J. (2013) Highly efficient enzymatic synthesis of GalB-(1→3)-GalNAc and GalB-(1→3)-GlcNAc in ionic liquids. *Tetrahedron*. **69**, 4973-4978.
- Schurig-Briccio, L.A., Venkatakrishnan, P., Hemp, J., Bricio, C., Berenguer, J., and Gennis R.B. (2013) Characterization of the nitric oxide reductase from *Thermus thermophilus*. *PNAS USA*. **110**, 12613-12618.
- Hidalgo, A., and Berenguer J. (2013) Biotechnological applications of *Thermus thermophilus* as host. *Current Biotech.* **2**, 304-312.
- Berenguer, J. (2013) Year's comments for 2013. *Int. Microbiol.* **16**, 211-215.
- Alvarez, L., Bricio, C., Blesa, A., Hidalgo, A., and Berenguer, J. (2014) The transferable denitrification capability of *Thermus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 19- 28.
- Swarts, D.C., Jore, M.M., Westra, E. R., Zhu, Y., Janssen, J.H., Snijders, A.P., Wang, Y., Patel, D.J., Berenguer, J., Brouns, S.J.J., and van der Oost, J.. (2014) DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*. **507**, 258-261.
- Alvarez, L., Bricio, C., Hidalgo, A., and Berenguer, J. (2014) Parallel pathways for nitrite reduction during anaerobic growth in *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, **196**, 1350-1358.
- C. Bricio, L. Alvarez, M. San Martín, Lici A. Schurig-Briccio, Robert B. Gennisy J. Berenguer (2014) A third subunit in ancestral cytochrome c dependent Nitric Oxide Reductases. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 4871-4878.

Tesis doctorales / Doctoral theses

- Noé Rigoberto Rivera** (2013). Termoestabilización de proteínas de interés biotecnológico. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: José Berenguer y Aurelio Hidalgo.
- Yamal Al-Ramahi González** (2013). Ingeniería de proteínas fluorescentes y aplicaciones de localización celular en microorganismos termófilos. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: José Berenguer y Aurelio Hidalgo.

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 (Hasta julio 2013)
Nathan M. Beach

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
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

Estudiantes /
Undergraduate Students:

Claudia Díez
Guillermo Blanco
Moisés E. Vargas

Resumen de investigación

Hemos puesto a punto el sistema de replicación del virus de la hepatitis C (VHC) en cultivos de células de hepatoma humano en colaboración con el Dr. Charles Rice de la Universidad de Rockefeller (N. York, USA). El virus se ha propagado un total de 100 pases durante los cuales ha aumentado su capacidad replicativa (fitness). Pases en presencia de interferón- α (IFN- α) han permitido obtener poblaciones resistentes al IFN- α y mapear las mutaciones responsables en varios genes del virus. Ello ha establecido una distinción entre los mecanismos de escape de virus a una presión selectiva enfocada a una proteína vírica (como es el caso de inhibidores dirigidos a las proteínas NS3, NS5A o NS5B del VHC) frente al escape a una respuesta antiviral múltiple (como la inducida por IFN- α). En este último caso el virus explora distintas mutaciones para superar las múltiples ramas de la barrera antiviral. La disponibilidad por vez primera de poblaciones y mutantes de VHC con distintos valores de fitness ha permitido demostrar que el fitness (o alguna propiedad estrechamente relacionada con el fitness) constituye un factor de resistencia a inhibidores de la replicación del virus. Ahora estamos evaluando el efecto del fitness del VHC sobre la eficacia de los nuevos tratamientos, en el modelo de cultivos celulares, siguiendo una colaboración con los grupos de Susanna Manrubia y Pablo Gastaminza.

Se han completado trabajos sobre mutagénesis letal, segmentación del genoma viral y actuación del trinquete de Muller en el virus herpes simplex, el último estudio en colaboración con el grupo del Dr. Enrique Tabarés.

Como parte de la participación en el CIBERehd nuestro grupo ha colaborado en la puesta a punto de nuevos métodos de secuenciación masiva aplicados al diagnóstico y planificación de tratamientos contra la infección por VHC.

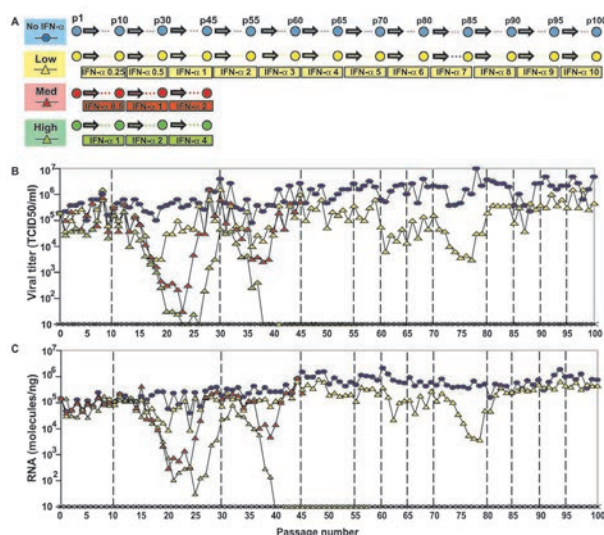


Figura 1. Pases seriados del virus de la hepatitis C (VHC) en células de hepatoma humano (Huh 7.5) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de interferón- α (IFN- α). Low, Med, High representan 3 líneas evolutivas con distinta concentración inicial de IFN- α . Los detalles sobre este estudio están en Perales et al. *J. Virol.*, 87(13), 7593-7607, 2013.

Figure 1. Serial passages of hepatitis C virus (HCV) in human hepatoma cells (Huh 7.5) in the absence or presence of increasing concentrations of interferon- α (IFN- α). Low, Med, High represent 3 evolutionary lines with a different initial IFN- α concentration. Details of this study are in Perales et al. *J. Virol.*, 87(13), 7593-7607, 2013.

Research summary

We have implemented the new system of replication of hepatitis C virus (HCV) in human hepatoma cells in culture, with the collaboration of Dr. Charles Rice of Rockefeller University (N. York, USA). The virus has been subjected to 100 serial passages in which the virus has increased its replicative capacity (fitness). Passages in the presence of interferon alpha (IFN- α) have led to IFN- α -resistant populations, and the mutations have been mapped throughout the genome. The results have established a distinction between mechanisms of HCV escape to a focused selective pressure (as is the case of inhibitors that target HCV proteins NS3, NS5A or NS5B) versus escape to a multicomponent antiviral response (such as that induced by IFN- α). In the latter case the virus explores several mutations to overcome the multiple branches of the antiviral barriers.

The availability for the first time of HCV populations with different fitness values has allowed the demonstration that fitness (or some feature closely related to fitness) is a factor of antiviral resistance of HCV. At present we are evaluating the effect of HCV fitness on the efficacy of new treatments in the cell culture model, as a follow-up of a collaboration with the groups of Susanna Manrubia and Pablo Gastaminza.

We have completed work on lethal mutagenesis, viral genome segmentation, and operation of Muller's ratchet, the latter study in collaboration with the group of Enrique Tabarés.

As part of the participation in CIBERehd our group has collaborated in the implementation of new deep sequencing methods applied to diagnosis and planning of treatments against HCV infection.

Publicaciones / Publications

Arias, A., de Ávila, A.I., Sanz-Ramos, M., Agudo, R., Escarmís, C. and Domingo, E. (2013) Molecular dissection of a viral quasispecies under mutagenic treatment: positive correlation between fitness loss and mutational load. *J. Gen. Virol.* **94**, 817-830.

Cubero, M., Gregori, J., Esteban, J.I., García-Cehic, D., Bes, M., Perales, C., Domingo, E., Rodríguez-Frías, F., Sauleda, S., Casillas, R., Sanchez, A., Ortega, I., Esteban, R., Guardia, J. and Quer, J. (2013) Identification of host and viral factors involved in a dissimilar resolution of a hepatitis C virus infection. *Liver International*.

Gregori, J., Esteban, J.I., Cubero, M., García-Cehic, D., Perales, C., Casillas, R., Alvarez-Tejado, M., Rodríguez-Frías, F., Guardia, J., Domingo, E. and Quer, J. (2013) Ultra-deep pyrosequencing (UDPS) data treatment to study amplicon HCV minor variants. *PLoS ONE*, **8**(12): e83361.

Jaramillo, N., Domingo, E., Muñoz, M.C., Tabarés, E., and Gadea, I. (2013) Evidence of Muller's ratchet in herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **94**, 366-75.

Ortega-Prieto, A.M., Sheldon, J., Grande-Pérez, A., Tejero, H., Gregori, J., Quer, J., Esteban, J.I., Domingo, E. and Perales, C. (2013) Extinction of hepatitis C virus by ribavirin in hepatoma cells involves lethal mutagenesis. *PLoS ONE*, **8**(8): e71039.

Perales, C., Beach, N. M., Gallego, I., Soria, M. E., Quer, J., Esteban, J. I., Rice, C., Domingo, E., and Sheldon, J. (2013). Response of hepatitis C virus to long-term passage in the presence of interferon- α . Multiple mutations and a common phenotype. *J. Virol.*, **87**(13), 7593-7607.

Domingo, E. and Perales C. (2014) Virus evolution. Encyclopedia of Life Sciences. Doi: 10.1002/9780470015902.a0000436.pub3. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Gregori, J., Salicrú, M., Domingo, E., Sanchez, A., Esteban, J.I., Rodríguez-Frías, F. and Quer, J. (2014) Inference with viral quasispecies diversity indices: clonal and NGS approaches. *Bioinformatics*.

Moreno, E., Ojosnegros, S., García-Arriaza, J., Escarmís, C., Domingo, E. and Perales C. (2014) Exploration of sequence space as the basis of viral RNA genome segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**(18):6678-83.

Perales, C., Beach, N.M., Sheldon, J. and Domingo E. (2014) Molecular basis of interferon resistance in hepatitis C virus. *Curr. Opin. Virol.* **8**: 38-44.

Saiz, J.C., Sobrino, F., Sevilla, N., Martín, V., Perales, C., Domingo, E. (2014) Molecular and evolutionary mechanisms of viral emergence. In: Singh, S. (ed). *Viral Infections and Climate Change*. John Wiley & Sons/ Wiley Blackwell Press, pp. 297-326.

Sheldon, J., Beach, N.M., Moreno, E., Gallego, I., Piñeiro, D., Martínez-Salas, E., Gregori, J., Quer, J., Esteban, J.I., Rice, C.M., Domingo, E., Perales, C. (2014) Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus. *J. Virol.* **88**(20):12098-111.

Otras actividades / Other activities

Académico Numerario de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, adscrito a la Sección de Ciencias Naturales, (desde 2011). Conferencia de divulgación científica por E. Domingo: "Virus y evolución. Más allá de la enfermedad".

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

Ignacio de la Higuera Hernández (2014). Factores determinantes del reconocimiento de nucleótidos en el virus de la fiebre aftosa. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Esteban Domingo.

Ana Mª Ortega Prieto (2014). Mutagénesis letal del virus de la Hepatitis C. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Esteban Domingo y Celia Perales.

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:
María Gimeno Pérez
Nandhakumar Moorthy
David Piedrabuena Estrada
Patricia Gutiérrez Alonso

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
María Asunción Martín Redondo

Estudiantes /
Undergraduate Students:
David Piedrabuena Estrada
Sofía Relaño Pérez
Zoran Merdzo Kunovac
Peter Elias Kidibule

Colaboraciones y Científicos
Visiting Scientists:
Miguel Remacha Moreno
Antonio Jiménez Martínez
Víctor Cifuentes
(Universidad de Chile)

Resumen de investigación

Trabajamos con microorganismos de interés biotecnológico, básicamente *Streptomyces*, hongos y levaduras, productores de compuestos bioactivos (entre ellos antibióticos y moléculas con actividad prebiótica). 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 operacional 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 métodos para su fijación a soportes sólidos.

Durante los últimos años hemos estado caracterizando y estudiando nuevas proteínas de levaduras no convencionales (incluidas en los géneros *Xanthophyllomyces*, *Schwanniomyces*, *Rhodotorula*, etc.) con actividad glicosiltransferasa, aplicables en la producción de azúcares con propiedades prebióticas. En general todas 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 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 (<http://www.glicoenz.org/p/glicoenz.html>).

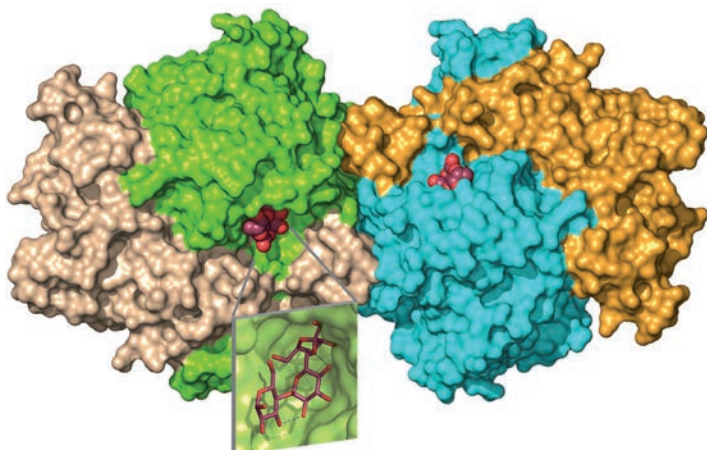


Figura 1. Estructura 3D de la fructofuranosidasa Xd-INV de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, una enzima productora del azúcar prebiótico neokestosa. La proteína fructosila distintos tipos de aceptores azucarados. Zoom, detalle del centro activo de una de las subunidades proteicas unida a neoerlosa, trisacárido formado por la fructosilación de maltosa.

Figure 1. The Xd-INV from *Xanthophyllomyces dendrorhous* 3D-Structure, a fructofuranosidase producing the prebiotic neokestose. Protein transfers fructose to a variety of acceptor sugars. Close-up view of one subunit active site including neoerlose, trisaccharide formed by maltose fructosylation.

Research summary

We work with microorganisms of biotechnological interest, mainly *Streptomyces*, fungi 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 enzymes producing bioactive compounds, the analysis of their structural-functional determinants, the operational improvement using molecular biology tools and in 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 methods for their attachment to solid supports.

During the last years we have been characterizing and studying several 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 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 (<http://www.glicoenz.org/p/glicoenz.html>).

Publicaciones / Publications

Fernández-Arrojo, L., Rodríguez-Colinas, B., Gutiérrez-Alonso, P., Fernández-Lobato, M., Alcalde, M., Ballesteros, A.O. and Plou, F.J. (2013) Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides". *Process Biochem.* **48**, 677-682.

de Abreu, M.A., Alvaro-Benito, M., Plou, F.J., Fernández Lobato, M.* and Alcalde, M.* (2013) Synthesis of 6-kestose using a highly efficient β -fructofuranosidase engineered by directed evolution. *Adv. Synth. Catal.* **355** (9), 1698-1702. * Both corresponding authors.

Álvaro Benito, M., Fernández Lobato, M., Baronian, K., and Kunze G. (2013) Assessment of *Schwanniomyces occidentalis* as a host for protein production using the wide-range Xplor®2 expression platform. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **97**(10), 4443-56.

Rodríguez-Colinas, B. Fernández-Arrojo, L., de Abreu, M., Urrutia, P., Fernández-Lobato, M., Ballesteros, A. O. and Plou, F. J. (2013) On the enzyme specificity for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides. In Shukla, P. and Pletschke, B.I (eds) *Advances in Enzyme Biotechnology*. Springer, pp 23-39. ISBN 978-81-322-1093-1 ISBN 978-81-322-1094-8 (eBook).

Gimeno-Pérez, M., Santos-Moriano, P., Fernández-Arrojo, L., Poveda, A., Jiménez-Barbero, J., Ballesteros, A., Fernandez-Lobato, M.*, Plou, F.J.* (2014) Regioselective synthesis of neo-erlose by the β -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*". *Process Biochem.* **49**, 423-429.* both corresponding authors.

Zambelli, P., Fernández-Arrojo, L., Romano, D., Santos-Moriano, P., Gimeno-Pérez, M., Poveda, A., Gandolfie, R., Fernández-Lobato, M., Molinari, F. and Plou, F.J. (2014) Production of fructooligosaccharides by mycelium-bound transfructosylation activity present in *Cladosporium cladosporioides* and *Penicillium sizovae*". *Process Biochem.* **49**, 2174-2180.

Gimeno-Pérez, M., Linde, D., Fernández-Arrojo, L., Plou, F. J. and Fernández Lobato, M (2014) Heterologous overproduction of β -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, an enzyme producing prebiotic sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

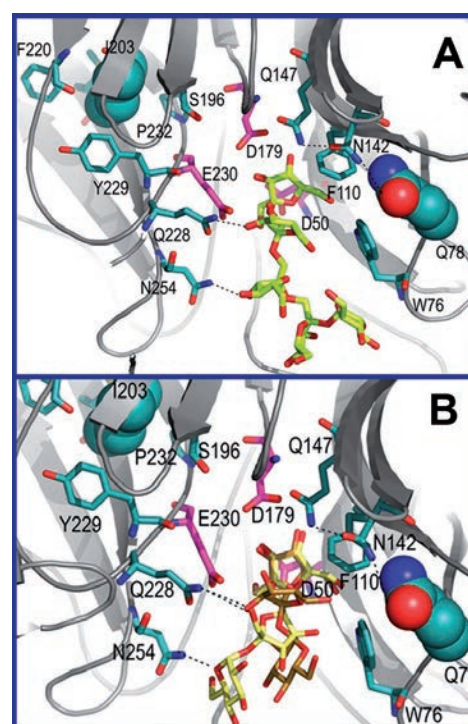


Figura 2. Mapeado de las mutaciones incluidas en la β -fructofuranosidasa Ffase mejorada por evolución molecular. Detalle de la estructura 3D del centro activo incluyendo los residuos catalíticos (rosa), otras posiciones relevantes para la actividad (ciano), las mutaciones generadas (magnificadas con esferas) y (A) el sustrato fructosil-nistosa (verde) o (B) los productos de transfructosilación 1-kestosa (marrón) y 6-kestosa (amarillo).

Figure 2. Mapping of mutations into β -fructofuranosidase Ffase improved by directed evolution. Close-up view of the active site 3D-structure showing catalytic residues (in pink), other relevant residues (in cyan), mutation generated (highlighted as spheres), and (A) the fructosyl-nystose substrate (green) or (B) the transfructosylating products 1-kestose (brown) and 6-kestose (yellow).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Patricia Gutiérrez Alonso (2013). Caracterización de dos glicosil-transferasas de oligosacáridos prebióticos de las levaduras *Phaffia rhodozyma* y *Rhodotorula dairenensis*. Universidad Autónoma de Madrid. 21-6-2013. Director: María Fernández Lobato.

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
Alejandro Valbuena Jiménez

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Pablo José Pérez Carrillo
María Medrano García
Silvia Daiana López Argüello

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 (Mateu (ed.) (2013) *Structure and Physics of Viruses*, Springer 2013; 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 (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, dinámica en equilibrio, reordenamientos estructurales y desensamblaje de virus; aplicación de este conocimiento al diseño de vacunas, fármacos antivirales y nanopartículas modificadas para la liberación dirigida de fármacos y otras aplicaciones bio- o nanotecnológicas.

Algunos resultados recientes: i) Mediante ingeniería de proteínas hemos identificado las bases moleculares de la inestabilidad térmica del virus de la fiebre aftosa, y producido racionalmente mediante ingeniería de proteínas partículas variantes de mayor termoestabilidad para el desarrollo de vacunas mejoradas. Con el mismo propósito, estamos investigando otras posibilidades para generar cápsidas vacías con propiedades físicas modificadas. ii) Estamos investigando mediante microscopía de fuerzas atómicas el ensamblaje, propiedades mecánicas, estabilidad y dinámica conformacionales de partículas víricas y ensamblados derivados de las mismas, utilizando el virus diminuto del ratón (MVM) y la cápsida del virus de la inmunodeficiencia humana como modelos. Los objetivos básicos de estos estudios incluyen el conocimiento detallado de los determinantes moleculares de las propiedades mecánicas y dinámica estructural de virus y la relevancia biológica de éstas para el proceso de infección. Los objetivos aplicados se orientan al desarrollo de nanopartículas víricas con propiedades mejoradas para usos biomédicos (liberación dirigida de fármacos y diseño de nuevos fármacos antivirales) y nanotecnológicos (nuevos biomateriales y nanodispositivos).

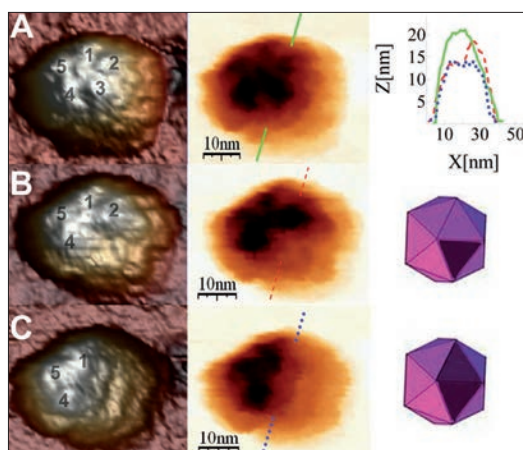


Figura 1. Desensamblaje gradual de una partícula individual del virus MVM mediante aplicación de fuerza mecánica, usando un microscopio de fuerzas atómicas. (A), imagen (positiva y negativa) de la partícula vírica intacta. (B), la aplicación de fuerza sobre esa misma partícula ha provocado la separación 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).

Research summary

Major research goals: We use protein engineering techniques and biochemical, biophysical and biological analyses to study assembly, conformational stability and dynamics of viruses (Mateu (ed.) (2013) *Structure and Physics of Viruses*, Springer 2013; 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 (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, equilibrium dynamics, structural rearrangements and disassembly; application of this knowledge for the design of vaccines, antiviral drugs and modified nanoparticles for targeted drug delivery, development of novel biomaterials and other biomedical or bionanotechnological applications.

Some recent results: i) We have identified the structural basis of the high thermal sensitivity of foot-and-mouth disease virus, and rationally produced by protein engineering, variant viral particles for the development of improved vaccines. With the same aim in mind, we are investigating other possibilities to produce empty capsids with modified physical properties. ii) we are investigating the assembly, mechanical properties, conformational stability and dynamics of viral particles and virus-derived molecular assemblies, using the minute virus of mice (MVM) and the human immunodeficiency virus capsid as models. The basic goals of these studies are a detailed understanding of the molecular determinants of the mechanical properties and structural dynamics of viruses, and their biological relevance for the infection process. The applied goal is to contribute to the development of viral nanoparticles with improved properties for biomedical and nanotechnological uses, including targeted drug delivery, design of novel antiviral drugs, biomaterials and nanodevices.

Publicaciones / Publications

Mateu, M.G. (2013). Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch. Biochem. Biophys.* **531**, 65-79.

Bocanegra, R., Alfonso, C., Rodríguez-Huete, A., Fuertes, M.A., Rivas, G. and Mateu, M.G. (2013). Association equilibrium of the HIV-1 capsid protein in a crowded medium reveals that hexamerization during capsid assembly requires a functional C-domain dimerization interface. *Biophys.J.* **104**, 884-893.

Mateu, M.G. (editor) (2013). *Structure and Physics of Viruses*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Mateu, M.G. (2013). The structural basis of virus function. In Mateu, MG (ed) *Structure and Physics of Viruses*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 3-51.

de Pablo, P.J. and Mateu, M.G. (2013). Atomic force microscopy of viruses. In Mateu, MG (ed) *Structure and Physics of Viruses*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 519-551.

Castellanos, M., Pérez, R., Grueso, E., Almendral, J.M., and Mateu, M.G. (2013). A slender tract of glycines is required for translocation of protein VP2 N-terminal domain through the parvovirus MVM capsid channel to initiate infection. *Biochem. J.* **455**, 87-94.

Rincón, V., Rodríguez-Huete, A., López-Argüello, S., Ibarra-Molero, B., Sánchez-Ruiz, J.M., Harmsen, M., and Mateu, M.G. (2014). Identification of the structural basis of thermal lability of a virus provides a rationale for improved vaccines. *Structure*, **22**, 1560-1570.

Otras actividades / Other activities

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

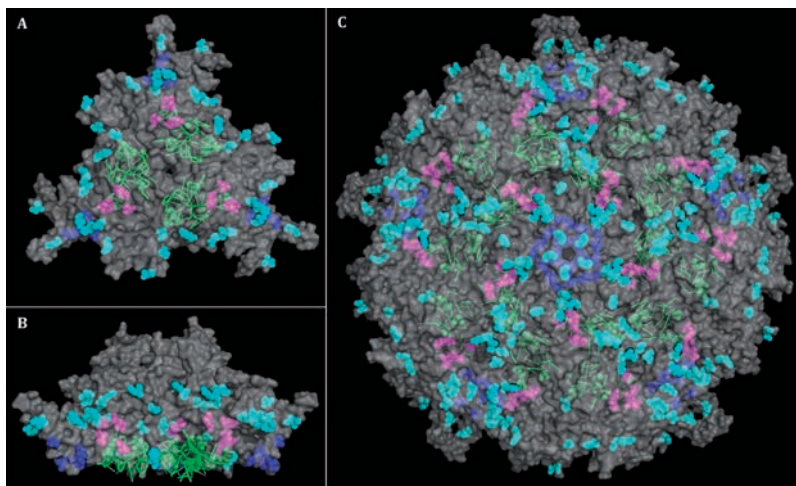
Mauricio G. Mateu, member of the Editorial Board of Virus Research.

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

Mauricio G. Mateu, editor of the book "Structure and Physics of Viruses", Springer SBM, The Netherlands, 2013.

Figura 2. Modificaciones estructurales en la capsida del virus MVM que afectan a sus propiedades mecánicas. A: elemento de ensamblaje (trímero de subunidades) de la cápsida visto de frente. B: trímero de perfil. C: pentámero de trímeros. Se indican en diferentes colores los residuos de la cápsida cuyo papel sobre las propiedades mecánicas de la partícula vírica hemos analizado en diferentes estudios.

Figure 2. Structural modifications in the capsid of MVM that have an effect on its mechanical properties. A: capsid building block (trimer of subunits), front view. B: trimer (side view). C: pentamer of trimers. Different colors are used for the capsid residues whose role in the mechanical properties of the viral particle has been analyzed in our laboratory.



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
Rurika Oka

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:

Silvia Lusa Bernal
Daniel López López

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Gema de Usera Guzmán

Resumen de investigación

Integración de información evolutiva y estructural para el estudio de la función de las proteínas. Simulación de procesos dinámicos de interacción proteína-proteína y proteína-ligando. Aproximaciones mediante interfaz híbrida Mecánica Molecular/Mecánica Cuántica (QM/MM). Desarrollo de nuevos sistemas de diseño de fármacos “in silico”. Análisis de datos de Secuenciación Masiva (NGS).

Proyectos en marcha:

1.- Desarrollo de un nuevo sistema más eficiente y preciso de aproximación QM/MM (FIREBALL/AMBER) para la simulación computacional de reacciones enzimáticas. El uso de interfaces Mecánica Cuántica / Mecánica Molecular (QM/MM) permite el uso simultáneo de ambos modos de simulación en el estudio de reacciones complejas, como las que ocurren en el centro activo de moléculas de interés biológico (biomoléculas). Desde los años 70 hasta la actualidad, los métodos de simulación QM/MM han tenido la necesidad de elegir entre precisión (utilizando sistemas ab-initio para la parte QM muy costosos computacionalmente) o eficiencia computacional (utilizando hamiltonianos semiempíricos que permiten un cálculo más rápido). En 2014, nuestro grupo, en colaboración con el grupo del Dr. José Ortega Mateo (Departamento of Física Teórica de la Materia Condensada, UAM), publicó un nuevo método de simulación QM/MM, llamado FIREBALL/AMBER (J. Chem. Theory Comput. 10 2185), con un nivel de teoría parecido al de Gaussian pero con una eficiencia computacional cientos de veces mayor, lo que supone un auténtico salto cualitativo en la simulación computacional de bioprocesos. El proyecto incluye tanto el desarrollo y refinamiento del sistema como su aplicación al estudio de reacciones enzimáticas de interés en biomedicina: Cohesinas SMC1A-SMC3, HIV-RT, FoF1-ATPasa, Carnitina aciltransferasas, la proteína bacteriana FtsZ, etc.

2.- Simulación mediante dinámica molecular de los procesos de polimerización y despolimerización de la proteína de septo bacteriano FtsZ. Diseño de inhibidores específicos que puedan utilizarse como antibacterianos usando sistemas “in silico” de diseño de fármacos basados en las propiedades de la molécula receptora. Proyecto desarrollado en el marco de un contrato de I+D entre Biomol-Informatics y la Fundación “Severo Ochoa”.

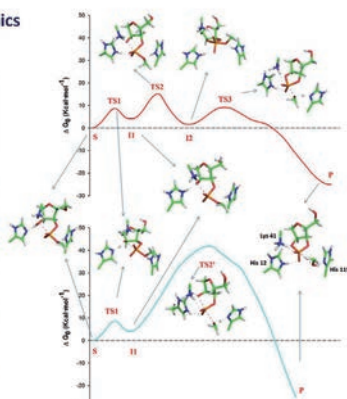
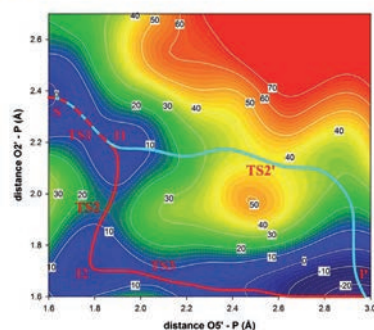


Figura 1. Una nueva aproximación Mecánica Cuántica / Mecánica Molecular (QM/MM): FIREBALL / Análisis de la superficie de energía libre de la reacción de RNasa A obtenida utilizando el sistema FIREBALL / AMBER (en kcal/mol).

Figure 1. A new Quantum Mechanics / Molecular Mechanics (QM/MM) approach: FIREBALL / AMBER. Analysis of the free-energy surface for the RNase A reaction obtained using the FIREBALL/AMBER system (in kcal/mol).

Research summary

Integration of evolutive and structural information to study the function of proteins. Simulation of dynamic processes of protein-protein and protein-ligand interaction. Hybrid Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) approaches. Development of novel “in silico” drug design systems. Next-Generation Sequencing (NGS) Data Analysis.

Current projects:

1.- Development of a more efficient and accurate system of QM/MM approach (FIREBALL/AMBER) for the computer simulation of enzymatic reactions. The use of Quantum Mechanics / Molecular Mechanics (QM/MM) interfaces allow the simultaneous use of both approaches in the study of complex reactions such as those occurring at the active centre of molecules of biological interest (biomolecules). From the 70s to the present, QM/MM simulation methods had to choose between accuracy (using computationally expensive ab-initio systems for the QM part) and computational efficiency (using semiempirical Hamiltonians that allow for a much faster calculation). In 2014, our group, in collaboration with the group of Dr. José Ortega Mateo (Department of Theoretical Condensed Matter Physics, UAM), published a new QM/MM simulation method, called FIREBALL/AMBER (J. Chem. Theory Comput. 10 2185), with a theory level similar to Gaussian but several hundred times more efficient, which represents a major step forward for the computer simulation of bioprocesses. The project involves both the development and refinement of the system and its application to the study of enzymatic reactions in proteins of interest to biomedicine: Cohesins SMC1A-SMC3, HIV-RT, FoF1-ATPase, Carnitine acyltransferases, the bacterial protein FtsZ, etc.

2.- Molecular dynamics simulation of polymerization and depolymerization processes of bacterial septum protein FtsZ. Design of specific inhibitors to be used as antibacterial drugs using “in silico” drug design systems based on the properties of the receptor molecule. This project is developed in the framework of an R&D contract between Biomol-Informatics and the Fundación “Severo Ochoa”.

Publicaciones / Publications

Baquero-Montoya, C., Gil-Rodríguez, M.C., Hernández-Marcos, M., Teresa-Rodrigo, M.E., Vicente-Gabas, A., Bernal, M.L., Casale, C.H., Bueno-Lozano, G., Bueno-Martínez, I., Queralt, E., Villa, O., Hernando-Davallillo, C., Armengol, L., Gómez-Puertas, P., Puisac, B., Selicorni, A., Ramos, F.J. & Pié, J. (2014). Severe ipsilateral musculoskeletal involvement in a Cornelia de Lange patient with a novel NIPBL mutation. *European Journal of Medical Genetics* **57**, 503-509.

Mendieta-Moreno, J.I., Walker, R., Lewis, J., *Gómez-Puertas, P., ^Mendieta, J. & ^Ortega, J. (*Corresponding authors; ^Co-last authors) (2014). FIREBALL/AMBER: An efficient local-orbital DFT QM/MM method for biomolecular systems. *Journal of Chemical Theory and Computation* **10**, 2185–2193.

Iozzo, P., Holmes, M., Schmidt, M.V., Cirulli, F., Guzzardi, M.A., Berry, A., Balsevich, G., Andreassi, M.G., Wesselink J.J., Liistro, T. Gómez-Puertas, P., Eriksson, J.G. & Seckl, J. (2014). Developmental ORIgins of Healthy and Unhealthy AgeIng: The Role of Maternal Obesity - Introduction to DORIAN. *Obesity Facts* **7**, 130-151.

López-Camacho, E., Rentero, Z., Ruiz-Carrascoso, G., Wesselink, J.-J., Pérez-Vázquez, M., Lusa-Bernal, S., Gómez-Puertas, P., Kingsley, R.A., Gómez-Sánchez, P., Campos, J., Oteo, J. & Mingorance, J. (2014). Design of clone-specific probes from genome sequences for rapid PCR-typing of outbreak pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* **20**, O891-893.

Betancor, G., ,Nevot, M., Mendieta, J., Gómez-Puertas, P., Martínez, M.A. & Menéndez-Arias, L. (2014). Molecular basis of the association of H208Y and thymidine analogue resistance mutations M41L, L210W and T215Y in the HIV-1 reverse transcriptase of treated patients. *Antiviral Research* **106**, 42-52.

Baquero-Montoya, C., Gil-Rodríguez, M.C., Braunholz D., Teresa-Rodrigo, M.E., Obieglo C., Gener, B., Schwarzmayer, T., Strom, T.M., Gómez-Puertas, P., Puisac, B., Gillissen-Kaesbach, G., Musio, A., Ramos, F.J., Kaiser, F.J. & Pié, J. (2014). Somatic mosaicism in a Cornelia de Lange syndrome patient with NIPBL mutation identified by different Next Generation Sequencing approaches. *Clinical Genetics* **86**, 595-597.

Gonzalez de Prado Salas, P., Hörger, I., Martín-García, F., Mendieta, J., Alonso, A., Encinar, M., Gómez-Puertas, P., Vélez, M. & Tarazona, P. (2014). Torsion and curvature of FtsZ filaments. *Soft Matter* **10**, 1977-1986.

Reis, F.P., Barbas, A., Klauer, A.A., Schaeffer, D., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., van Hoof, A. & Arraiano, C.M. (2013). Modulating the RNA processing and decay by the exosome: altering Rps44/Dis3 activity and end-product. *PLoS ONE* **8**(11): e76504.

Ramos, M., Menao, S., Arnedo, M., Puisac, B., Gil-Rodríguez, M.C., Teresa-Rodrigo, M.E., Hernández-Marcos, M., Pierre, G., Ramaswami, U., Baquero-Montoya, C., Bueno, G., Casale, C., Hegardt, F.G., Gómez-Puertas, P. & Pié, J. (2013). New case of Mitochondrial HMG-CoA Synthase deficiency. Functional analysis of eight mutations. *European Journal of Medical Genetics* **56**, 411-415.

Puisac, B., Teresa-Rodrigo, M.E., Arnedo, M., Gil-Rodríguez, M.C., Pérez-Cerdá, C., Ribes, A., Pié, A., Bueno, G., Gómez-Puertas, P. & Pié, J. (2013). Analysis of aberrant splicing and nonsense-mediated decay of the stop codon mutations c.109G>T and c.504_505delCT in 7 patients with HMG-CoA lyase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* **108**, 232-240.

Martín-García, F., Mendieta-Moreno, J.I., Marcos-Alcalde, I., *Gómez-Puertas, P. & Mendieta, J. (*Corresponding author). (2013). Simulation of catalytic water activation in mitochondrial F1-ATPase using a hybrid quantum mechanics/molecular mechanics approach: An alternative role for β -Glu 188. *Biochemistry* **52**, 959-966.

Porteguer, M.J., Gómez-Puertas, P., Cañavate, C., Dagger, F., Gárate, T. & Valdivieso, E. (2013). Ddi1-like protein from *Leishmania major* is an active Aspartyl-Proteinase. *Cell Stress & Chaperones* **18**, 171–181.

Otras actividades / Other activities

El Grupo de Modelado Molecular ha participado en varios Master y 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” (2008-2016). Miembros del grupo participan como IP en los proyectos del 7PM-UE: Divinocell, Dorian, EpiTraits (Marie Curie-ITN) y ENABLE (IMI, CE-EFPIA).

The Molecular Modelling Group has participated in several Master and postgraduate specialization courses and 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” (2008-2016). Members of the group partipates as PI in the 7FP-EU projects: Divinocell, Dorian, Epi-Traits (Marie Curie-ITN) and ENABLE (IMI, CE-EFPIA).

Desarrollo de herramientas genéticas para la manipulación de bacterias Gram+ a partir de la caracterización molecular de un plásmido de *Bacillus*

Developing genetic tools to modify clinically and industrially relevant Gram+ bacteria by exploring transfer and other functions of a Bacillus plasmid



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

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

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Andrés Miguel Arribas
César Gago Córdoba
Jorge Val Calvo
Jacobó Bustamante Rodríguez
Arantxa López Pérez

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Ken Ichi Yoshikawa
Shogo Tsuji

Resumen de investigación

Las bacterias evolucionan rápidamente debido a su capacidad para intercambiar material genético a través de diferentes procesos, colectivamente denominado transferencia horizontal de genes (HGT). Además de un único cromosoma, muchas bacterias contienen unidades llamadas plásmidos que replican de forma autónoma. Muchos de ellos son portadores de genes que les permiten ser transferidos a otras bacterias. Este proceso, llamado conjugación, contribuye significativamente a HGT. Muchos plásmidos también contienen genes de resistencia a antibióticos. Por lo tanto, la conjugación de plásmidos juega un papel importante en la diseminación de estos genes. La comprensión de los diferentes aspectos del proceso de conjugación es esencial para el diseño de estrategias para combatir la propagación de la resistencia a los antibióticos. La conjugación también tiene un lado positivo: es un método eficaz para modificar genéticamente las bacterias de importancia industrial, clínica y científica que son reacias a su modificación por otros métodos. Varios plásmidos de conjugación que tienen su origen en bacterias Gram-negativas han sido estudiados en detalle. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la conjugación de plásmidos de origen Gram-positivo. Hay una necesidad urgente de comprender mejor la diseminación de resistencia a los antibióticos mediada por conjugación en bacterias Gram-positivas, así como el desarrollo de herramientas genéticas para modificar bacterias Gram-positivas. En nuestro laboratorio estudiamos diversos aspectos de la conjugación utilizando como sistema modelo el plásmido pLS20 de la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis*. Nuestros objetivos a corto y largo plazo son que el conocimiento que se obtiene mediante el estudio de pLS20 se pueda utilizar en el desarrollo de herramientas genéticas y diseñar estrategias para evitar la diseminación de resistencia a antibióticos en bacterias Gram positivas. Otra razón por la que elegimos pLS20 para nuestros estudios es que *B. subtilis* forma parte del microbioma humano y la conjugación puede alterar las características de estas bacterias intestinales, lo que da pie a este estudio.

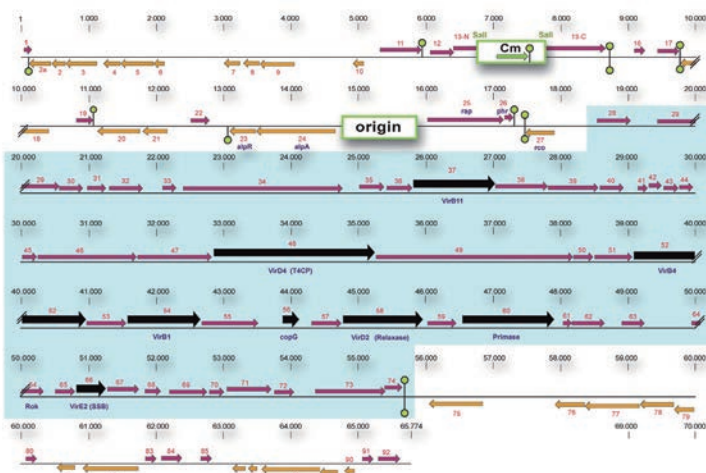


Figura 1. Mapa genético del plásmido conjugativo pLS20 de *B. subtilis*.

Figure 1. Genetic map of *B. subtilis* conjugative plasmid pLS20.

Research summary

Bacteria evolve rapidly due to their short generation time and their ability to exchange genetic material, which can occur via different processes, collectively named Horizontal Gene Transfer (HGT). Most bacteria contain, besides a single chromosome, autonomously replicating units called plasmids. Many plasmids carry genes enabling them to be transferred into plasmid-free bacteria. This process, called conjugation, contributes significantly to HGT. Many plasmids also contain antibiotic resistance genes. Therefore, plasmid conjugation plays a major role in the spread of these genes. Understanding different aspects of the conjugation process, including the regulation of conjugation genes, is essential for designing strategies to combat the spread of antibiotic resistance. Conjugation also has a positive side: it is an efficient method to genetically modify bacteria of industrial, clinical and scientific relevance that are reluctant to modification by other methods. Several conjugative plasmids of Gram negative origin have been studied in considerable detail over the last decades. However, remarkably little is known about conjugation of plasmids from Gram positive origin. There is an urgent need to better understand conjugation-mediated spread of antibiotic resistance in Gram positive bacteria, and to develop genetic tools to modify Gram positive bacteria. In our laboratory we study various aspects of conjugation using as a model system plasmid pLS20 from the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis*. Our short and long term goals are that the knowledge we obtain by studying pLS20 can be used for the development of genetic tools (short term) and to design strategies to interfere with antibiotic resistance and virulence determinants in Gram positive bacteria (long term). An additional reason why we chose pLS20 for our studies is that *B. subtilis* forms part of the human microbiome, and conjugation may evidently alter the features of gut bacilli, which warrants this analysis.

Publicaciones / Publications

Ramachandran, G, Singh, P.K., Luque-Ortega, J.R., Yuste, L., Alfonso, C., Rojo, F., Wu, L.J. and Meijer, W.J.J. (2014) A complex genetic switch involving overlapping divergent promoters and DNA looping regulates expression of conjugation genes of a Gram-positive plasmid. *PLoS Genet.* **10**(10):e1004733.

Singh, P.K., and Meijer, W.J.J. (2014) Diverse regulatory circuits for transfer of conjugative elements. *FEMS Microbiol. Lett.* **358**(2), 119-28.

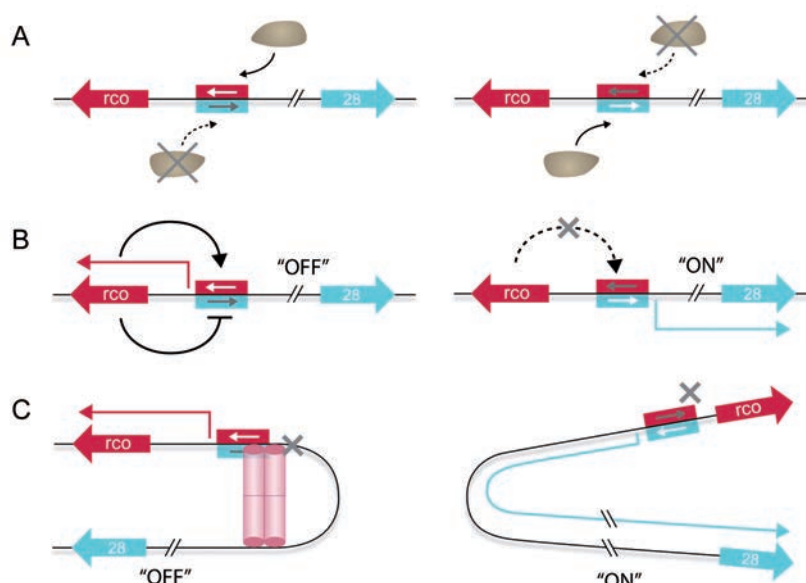
Singh, P.K., Ramachandran, G., Ramos-Ruiz, R., Peiró-Pastor, R., Abia, D., and Meijer, W.J.J. (2013) Mobility of the native *Bacillus subtilis* conjugative plasmid pLS20 is regulated by intercellular signaling. *PLoS Genet.* e1003892.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Praveen Kumar Singh (2014). Characterization of a native plasmid from *Bacillus subtilis* with special focus on its regulatory circuit for conjugation. Universidad Autónoma Madrid.

Figura 2. La expresión de los genes de conjugación está controlada por un "interruptor" genético compuesto de tres niveles siendo promotores solapantes (A), Autorregulación del represor del promotor conjugativo (B) y "DNA looping" (C).

Figure 2. Expression of the conjugation genes is controlled by a genetic switch that is composed of at least three layers, being overlapping promoters (A) Autoregulation of the repressor of the conjugation promoter (B) and DNA looping (C).



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
Beatriz Pacheco González

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Verónica Barrioluengo Fernández
Gilberto J. Betancor Quintana
César Garriga Fuentes
Alba Sebastián Martín

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Sofía Chayeb Khouili
Alberto Fernández Oliva

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Atsushi Konishi
(Kyoto University, Japan)

Resumen de investigación

Se estima que actualmente hay más de 35 millones de personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en todo el mundo. A pesar de los éxitos de la terapia antirretroviral, el virus todavía causa 1,6 millones de muertes anualmente. La retrotranscriptasa (RT) del VIH juega un papel clave en la replicación del ARN genómico del virus y sus inhibidores constituyen la base de los tratamientos actuales más utilizados y eficaces. El VIH tiene una enorme variabilidad genética facilitada en parte por la elevada tasa de error de su RT, que carece de actividad correctora de errores. La aparición de cepas resistentes puede conducir al fracaso del tratamiento antirretroviral.

Nuestros esfuerzos 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 RT del VIH tipo 1 (VIH-1); y (2) determinar cuáles son los mecanismos moleculares implicados en resistencia a inhibidores de dicha polimerasa. En este contexto estudiamos el papel de mutaciones secundarias en el desarrollo de resistencia a fármacos antirretrovirales, en particular de aquellos cambios que no son tenidos en cuenta en pruebas clínicas utilizadas para seleccionar los tratamientos antirretrovirales más adecuados para cada paciente.

Por otro lado, hemos obtenido variantes de la RT del VIH-1 de grupo O potencialmente útiles en biotecnología para estudiar expresión génica, ya que poseen elevada estabilidad térmica y actividad a altas temperaturas. Otros proyectos que se desarrollan actualmente en el laboratorio se centran en el análisis de la fidelidad de copia de variantes de la RT del VIH tipo 2 resistentes a fármacos antirretrovirales y en la identificación de factores celulares implicados en el bloqueo de la infección por el VIH-1 en primates del género *Callithrix* (proyecto liderado por la Dra. B. Pacheco).

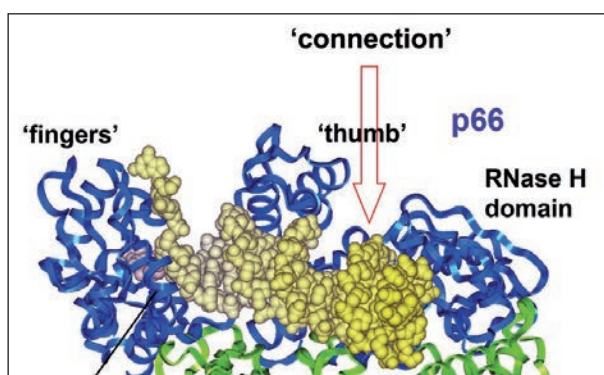


Figura 1. Los aminoácidos situados en los subdominios "thumb" y "connection" y en el dominio RNasa H de la RT del VIH-1 pueden influir en la resistencia al AZT y otros análogos a nucleósido debido a que modifican el equilibrio existente entre la actividad RNasa H de la RT y la capacidad de la enzima para eliminar el inhibidor del extremo 3' del DNA sintetizado.

Figure 1. Amino acid residues in the HIV-1 RT thumb-connection subdomains and the RNase H domain can modulate resistance to AZT and other nucleoside inhibitors by altering the balance between excision and template RNA degradation.

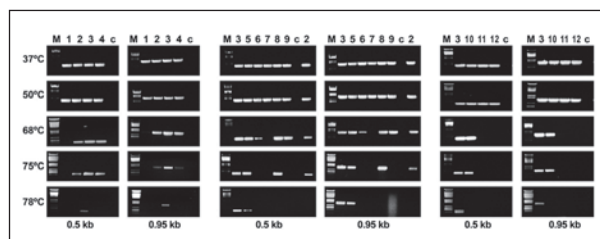


Figura 2. Ensayos de RT-PCR en los que se muestra el efecto de la temperatura sobre la síntesis de cDNA catalizada por distintas variantes de la RT del VIH-1 grupo O (Matamoros et al. 2013; *Biochemistry* 52, 9318).

Figure 2. RT-PCR assays showing the effect of the temperature on the cDNA synthesis catalyzed by engineered recombinant HIV-1 group O RT variants (Matamoros et al. 2013; *Biochemistry* 52, 9318).

Research summary

Around 35 million people worldwide are infected with the human immunodeficiency virus (HIV) and despite significant advances in antiretroviral therapy HIV still causes 1.6 million deaths each year. The HIV genome is composed of two copies of single-stranded RNA. The viral reverse transcriptase (RT) is responsible for the replication of the HIV genome. RT inhibitors constitute the backbone of the most popular and effective treatments. HIV shows remarkable variability due in part to the lack of proof-reading activity of its polymerase. The elevated mutation rate of the virus facilitates the emergence of drug-resistant strains and a potential failure of the antiretroviral therapy.

Recently, our efforts have been directed towards two major goals: (1) understanding the role of different amino acids in the nucleotide specificity of HIV type 1 (HIV-1) RT, as well as in its fidelity of DNA synthesis; and (2) the elucidation of molecular mechanisms involved in RT inhibitor resistance. In this context we study the mechanisms by which secondary mutations contribute to the selection of drug-resistant strains, and particularly those changes that are not identified in genotypic tests that guide decisions on prescription of antiretroviral therapies.

On a different project, we have obtained HIV-1 group O RT variants that show increased thermal stability and retain significant polymerase activity at temperatures above 60°C. These RTs are being developed into useful tools to study gene expression. Other projects currently in execution in the lab are focused on the analysis of the DNA copying fidelity of HIV type 2 RT variants resistant to antiretroviral drugs and the identification of host cell factors that block HIV-1 infection in primates of the *Callithrix* genus (project led by Dr. B. Pacheco).

Publicaciones / Publications

Álvarez, M., Barrioluengo, V., Afonso-Lehmann, R. and Menéndez-Arias, L. (2013) Altered error specificity of RNase H-deficient HIV-1 reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4601-4612.

Tózsér, J., Menéndez-Arias, L. and Oroszlan, S. (2013) Chapter 47 – Equine anemia infectious virus retropepsin. In: Rawlings, N. D. and Salvesen, G. (ed) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd ed., Volume 1 – Aspartic and metallopeptidases. Academic Press, London, UK, pp. 207-210.

Menéndez-Arias, L., Tózsér, J. and Oroszlan, S. (2013) Chapter 52 – Mouse mammary tumor virus retropepsin. In: Rawlings, N. D. and Salvesen, G. (ed) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd ed., Volume 1 – Aspartic and metallopeptidases. Academic Press, London, UK, pp. 223-226.

Menéndez-Arias, L., Tózsér, J. and Oroszlan, S. (2013) Chapter 53 – Moloney murine leukemia virus retropepsin. In: Rawlings, N. D. and Salvesen, G. (ed) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd ed., Volume 1 – Aspartic and metallopeptidases. Academic Press, London, UK, pp. 226-230.

Menéndez-Arias, L. (2013) Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: Overview and recent developments. *Antiviral Res.* **98**, 93-120.

Menéndez-Arias, L. and Gago, F. (2013) Antiviral agents: Structural basis of action and rational design. In: Mateu, M. G. (ed) *Structure and physics of viruses: an integrated textbook*, Subcellular Biochemistry vol. 68, pp. 599-630, Springer Science+Business Media, Dordrecht, Germany.

Menéndez-Arias, L. (2013) HIV reverse transcriptase fidelity, clade diversity, and acquisition of drug resistance. In: Le Grice, S. F. J. and Götte, M. (ed) *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase: a bench-to-bedside success*. Springer Science+Business Media, New York, USA, pp. 225-252.

Matamoros, T., Barrioluengo, V., Abia, D. and Menéndez-Arias, L. (2013) Major groove binding track residues of the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase enhance cDNA synthesis at high temperatures. *Biochemistry* **52**, 9318-9328.

Álvarez, M. and Menéndez-Arias, L. (2014) Temperature effects on the fidelity of a thermostable HIV-1 reverse transcriptase. *FEBS J.* **281**, 342-351.

Betancor, G., Nevot, M., Mendieta, J., Gómez-Puertas, P., Martínez, M.A. and Menéndez-Arias, L. (2014) Molecular basis of the association of H208Y and thymidine analogue resistance mutations M41L, L210W and T215Y in the HIV-1 reverse transcriptase of treated patients. *Antiviral Res.* **106**, 42-52.

Pauls, E., Ruiz, A., Badia, R., Permyanov, M., Gubern, A., Riveira-Muñoz, E., Torres-Torres, J., Álvarez, M., Mothe, B., Brander, C., Crespo, M., Menéndez-Arias, L., Clotet, B., Keppler, O.T., Martí, R., Posas, F., Ballana, E. and Esté, J.A. (2014) Cell cycle control and HIV-1 susceptibility are linked by CDK6-dependent CDK2 phosphorylation of SAMHD1 in myeloid and lymphoid cells. *J. Immunol.* **193**, 1988-1997.

Konishi, A., Hisayoshi, T., Yokokawa, K., Barrioluengo, V., Menéndez-Arias, L. and Yasukawa, K. (2014) Amino acid substitutions away from the RNase H catalytic site increase the thermal stability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase through RNase H inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454**, 269-274.

Menéndez-Arias, L. and Álvarez, M. (2014) Antiretroviral therapy and drug resistance in human immunodeficiency virus type 2 infection. *Antiviral Res.* **102**, 70-86.

Menéndez-Arias, L. and Richman, D. D. (2014) Editorial overview: Antivirals and resistance: Advances and challenges ahead. *Curr. Opin. Virol.* **8**, iv-vii.

Menéndez-Arias, L., Álvarez, M. and Pacheco, B. (2014) Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Curr. Opin. Virol.* **8**, 1-9.

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.) (2014) *The HIV & Hepatitis Drug Resistance and PK Guide*. Thirteenth Edition. Fundació de Lluita contra la SIDA, Barcelona, Spain, 706 pp. Available from: <http://www.flisida.org/theguide>

Otras actividades / Other activities

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

Editor académico de *PLoS ONE* / Academic editor of *PLoS ONE*.

Editor invitado del número especial de octubre de 2014 sobre fármacos antivirales y resistencia de la revista *Current Opinion in Virology* (Octubre 2014) / Guest editor of the special issue of October 2014 on antiviral drugs and resistance in *Current Opinion in Virology*.

Medalla de la Sociedad Médica de la Universidad de Tohoku, Sendai, Japón, marzo de 2013 / Tohoku Medical Society Lecture Medal 2013, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan, March 2013.

Patentes / Patents

L. Menéndez Arias, T. Matamoros, D. Abia, V. Barrioluengo. Retrotranscriptasas del VIH tipo 1 grupo O, activas a temperaturas elevadas / HIV-1 group O reverse transcriptases, active at high temperatures. Ref.: PCT/ES2014/070389. Propietario/Owner: C.S.I.C. País/Country: Spain. Licenciataria/Licensee: Sygnis Bioscience GmbH & Co. KG.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Verónica Barrioluengo Fernández (2013). Diseño, obtención y caracterización de variantes de la retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana de interés biotecnológico. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Luis Menéndez Arias.

Gilberto José Betancor Quintana (2013). Mechanistic insights into the role of secondary mutations of HIV-1 reverse transcriptase in the acquisition of antiretroviral drug resistance. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Luis Menéndez Arias. Distinguida con Premio Extraordinario de Doctorado.

César Garriga Fuentes (2014). Estudios transversales sobre resistencia genotípica a fármacos antirretrovirales en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón (Madrid). Directores: Luis Menéndez Arias y Ángel Gil de Miguel.

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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Daniel Pérez Núñez
Elena García Sánchez

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ana Quintas Gorozarri

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
María Luisa Nogal París

Composición del Subgrupo
de Investigación:

Personal Científico /
Responsable de Proyecto /
Scientific Staff:
Ángel L. López Carrascosa

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Patricia de León Valdés

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
María J. Bustos Sánchez

Resumen de investigación

Muchos virus presentan interés básico y aplicado por ser causantes de importantes enfermedades en las que la respuesta inmune es ineficaz. Es el caso de la peste porcina africana, una devastadora enfermedad causada por un complejo virus (VPPA), para la que no existe vacuna. La transmisión de la enfermedad se mantiene bajo diferentes escenarios epidemiológicos, incluyendo cerdo doméstico, jabalíes y garrapatas. La infección es endémica en el África Sub-Sahariana, Cerdeña y recientemente en Cáucaso y Rusia, lo que junto con la aparición de brotes en Ucrania y Polonia, está amenazando a la Unión Europea. Además, la emergencia de cepas atenuadas indetectables por los kits de diagnóstico disponibles, contribuye a la diseminación de la enfermedad. Por ello analizamos los niveles de citoquinas en células porcinas infectadas por cepas atenuadas y virulentas, caracterizando factores específicos de la atenuación. En este sentido, uno de nuestros objetivos es además, desarrollar kits de ELISA y/o PCR/RT-PCR más sensibles.

Asimismo estamos caracterizando mecanismos de interacción entre el virus y la célula infectada, con especial énfasis en la entrada, internalización y tráfico viral, basándonos en la experiencia reciente del equipo en este tipo de estudio.

Finalmente, nos proponemos desarrollar herramientas y estrategias para generar vacunas frente al VPPA. Para ello, estamos manipulando el genoma de cepas atenuadas del virus, obteniendo mutantes carentes de genes cuyos productos modulan la expresión de MHC-I (EP153R), regulan la producción de IFN- β (A276R y A528R), o interfieren con factores pro-inflamatorios (A238L). Alternativamente, éstos u otros genes serán incorporados en vectores vacunales, tipo amplicón PRV ó Parapox, para ensayar su potencial protección en cerdos, bajo distintas pautas de vacunación. Gran parte de la información requerida para seleccionar los genes y mecanismos candidatos es resultado del trabajo de muchos años de varios de los componentes de esta Línea de Investigación.

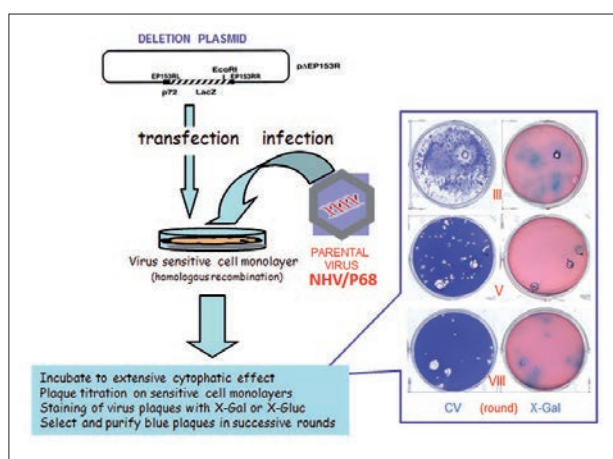


Figura 1. Esquema de la construcción de VPPA defectivos en genes específicos.

Figure 1. Scheme for construction of ASFV defective in specific genes.

Research summary

Certain viruses are the major causative agents of diseases by interfering key host pathways and leading to an ineffective immune response. This is the case of African swine fever, a devastating disease caused by a complex virus (ASFV), for which no vaccine is available.

The transmission of the infection remains under different epidemiological settings, including domestic and wild pigs, wild boar and ticks, and is endemic in sub-Saharan Africa, Sardinia and recently in Caucasus and Russia. The situation is also worrying since declared outbreaks in Ukraine and Poland, are threatening the European Union. In addition, the emergence of new attenuated strains, undetectable by available diagnostic kits, contributes to dissemination. Thus, we are analyzing the levels of cytokines in porcine cells infected with attenuated or virulent viral isolates to characterize specific factors of attenuation. In addition, other of our objectives is to develop more sensitive ELISA and / or PCR type tools.

We are also characterizing mechanisms of interaction between the virus and the infected cell, with special emphasis on the entry, viral internalization and trafficking, based on previous experience of the team in the study of ASFV.

Finally, our group aims to generate vaccines against ASFV by using different approaches. In one of them, we manipulate attenuated virus strains, to obtain mutants lacking genes that modulate the expression of MHC-I, as EP153R, or which regulate the production of IFN- β , as A276R and A528R, or able to interfere pro-inflammatory factors, like A238L. Alternatively, these and other viral genes will be incorporated into vaccine vectors (amplicons type PRV or Parapox), to be tested in animals under different new guidelines. Obviously, much of the information required to select candidate genes to be manipulated come from previous work by over 20 years of laboratories that make up this Line of research.

Publicaciones / Publications

Sánchez, E.G., Quintas, A., Nogal, M.L., Castelló, A., and Revilla, Y. (2013) African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. *Virus Research* **173**, 58-133 (Review).

Gallardo, C., Soler, A., Nieto, R., Carrascosa, A.L., De Mía, G.M., Bishop, R.P., Martins, C., Folorunso, O.F., Couacy-Hymman, E., Heath, L., Martín, E., Simón, A., Martín, R. and Arias, M. (2013) 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.* **162**, 32-43.

De León, P., Bustos, M.J. and Carrascosa, A.L. (2013) Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus Research* **173**, 168-179 (Review).

Otras actividades / Other activities

Yolanda Revilla Novella, ASFORCE Scientific Committee Member. Comisión Europea 2013.

Ángel L. Carrascosa, 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 2012-13, 2013-14 y 2014-15.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Elena García Sánchez. "Estudio de la Macropinocitosis como Mecanismo Endocítico de Entrada del Virus de la Peste Porcina Africana". Universidad Autónoma de Madrid. Diciembre 2013 (sobresaliente). Directora: Yolanda Revilla Novella.

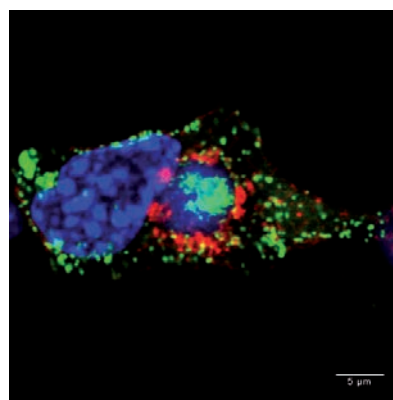


Figura 2. Factorías virales rodeadas por las proteínas del VPpA p72 y CD2v durante la infección de células COS-7.

Figure 2. Viral factories surrounded by ASFV p72 and CD2v proteins during infection of COS-7 cells.

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:
Mónica González Magaldi
Mónica Gutiérrez Rivas
Gema Lorenzo Alguacil
Ángela Vázquez Calvo
Miguel Rodríguez
(Contratado Juan de la Cierva)
Miguel Ángel Martín
(Contratado JAE post)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:

Yuri A. Vieira
Flavia Caridi

Estudiantes /
Undergraduate Students:

Fabio Antenucci
Rodrigo Cañas
Katherine I. Calderón

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 elevada capacidad de variación y sus diferentes hospedadores naturales condicionan el control de la enfermedad que produce. Se trabaja en el desarrollo de nuevas vacunas peptídicas marcadoras frente al VFA capaces de inducir respuestas humerales y celulares protectoras empleando como modelo un importante hospedador natural del VFA: el cerdo. 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). 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 distintos componentes celulares. Se estudia también el papel que juegan diferentes lípidos celulares en la multiplicación de estos virus y de otros como el virus del Nilo Occidental (VNO) responsable de una importante zoonosis. Como parte de estos estudios se ha caracterizado la capacidad del ácido valproico para inhibir la multiplicación de diferentes virus con envoltura.

Por otra parte, se trabaja el estudio de las implicaciones funcionales de regiones no codificantes del ARN de VFA, en particular en su capacidad para inducir respuestas inmunes innatas y su uso potencial como elementos antivirales e inmunomoduladores de amplio espectro cuando se administran como transcritos de RNA. En conjunto, los resultados obtenidos están siendo empleados para la identificación de dianas antivirales y determinantes de atenuación viral, así como para el desarrollo de nuevas vacunas y estrategias para su inmunomodulación (adyuvantes).

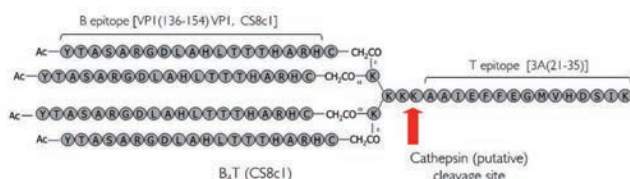


Figura 1. Esquema del primer prototipo de péptido dendrimerico capaz de conferir protección completa frente al desafío con VFA en cerdo. Las secuencias corresponden al aislado de VFA de serotipo C (Cubillos et al., J. Virol 82, 7223, 2008).

Figure 1. Scheme of the first prototype of FMDV dendrimeric peptide vaccine that conferred solid protection against virus challenge in pig. The sequences correspond to type C FMDV (Cubillos et al., J. Virol 82, 7223, 2008).

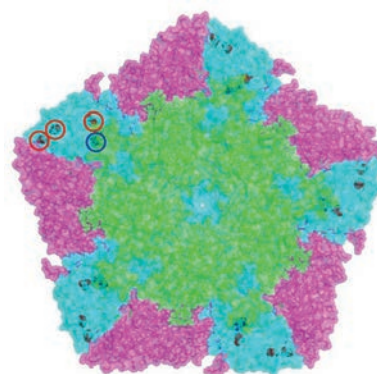


Figura 2. Representación de una subunidad pentamérica de la cápsida del VFA mostrando la posición de mutaciones que incrementan (rojo) o reducen (azul) la sensibilidad frente a pH ácido de la partícula viral. VP1 verde, VP2 en magenta, VP3 en cyan.

Figure 2. 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.

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.

A parallel study of the functional implications of non-coding RNA regions is being conducted, in particular the analysis of their capacity to elicit innate immune responses and their potential use as antiviral and immunomodulatory elements after delivery as synthetic RNA transcripts. Overall, the results obtained are being used for the identification of antiviral targets, attenuation determinants as well as for the design of new vaccine strategies and immunomodulators (adjuvants).

Publicaciones / Publications

Vázquez-Calvo, A., Martín-Acebes, M.A., Sáiz, J.C., Sobrino, F. and de la Torre, J.C. (F. Sobrino, corresponding author). Inhibition of multiplication of the prototypic arenavirus LCMV by valproic acid. *Antiviral Res.* **99**, 172-179 (2013).

Sanchez-Aparicio, M.T., Rosas, M.F. and Sobrino, F. Characterization of a nuclear localization signal in the foot-and-mouth disease virus polymerase. *Virology* **444**, 203-210 (2013).

Borrego, B., Rodríguez-Pulido, B., Mateos, F., de la Losa, N., Sobrino, F. and Sáiz, M. Delivery of synthetic RNA can enhance the immunogenicity of vaccines against foot-and-mouth disease virus (FMDV) in mice. *Vaccine* **40**, 4375-4381 (2013).

Blanco, E., Cubillos, C., Moreno, N., Bárcena, J., de la Torre, B.G., Andreu and Sobrino, F. B epitope multiplicity/ and B/T epitope orientation influence immunogenicity of foot-and-mouth disease peptide vaccines. *Clin. Dev. Immunol.* 2013:475960 (2013).

Martín-Acebes, M.A. Vázquez-Calvo, A., Caridi, F., Saiz, J.C. and Sobrino, F. Lipid Involvement in Viral Infections: Present and Future Perspectives for the Design of Antiviral Strategies. In: *Lipid Metabolism*. pp. 291-322. ISBN 978-953-51-0944-0. R. Valenzuela (ed.). Intech. Rijeka, Croatia. (2013).

Rodríguez-Pulido, M., Sobrino, F., Borrego, B., Sáiz M. Use of RNA domains in the viral genome as innate immunity inducers for antiviral strategies and vaccine improvement. In: *Current Issues in Molecular Virology-Viral Genetics and Biotechnological Applications*. ISBN 978-953-51-1207-5. Romanowski V. and Garcia M. (Eds.), Intech. Rijeka, Croatia. (2013).

Vazquez-Calvo, A. Caridi, F. Sobrino, F. and Martín-Acebes, M.A. (F. Sobrino: corresponding author). An increase in acid resistance of foot-and-mouth disease virus capsid is mediated by a tyrosine substitution of the VP2 histidine previously associated with VP0 cleavage. *J. Virol.* **88**, 3039-3042. (2014).

F. Sobrino. Sin ciencia no hay futuro. *Revista de la Sociedad Española de Virología*. **16**, 3-5 (2013).

Protection against Rift Valley fever virus infection in mice upon administration of interferon-inducing RNA transcripts from the FMDV genome. *Antiviral. Lorenzo, G., Rodríguez-Pulido, M., López-Gil, E., Sobrino, F., Borrego, B., Sáiz, M. and Brun, A. Antiviral Res.* **109**, 64-67 (2014).

The Composition of West Nile virus Lipid Envelope Unveils a Role of Sphingolipid Metabolism on Flavivirus Biogenesis. Martín-Acebes, M.A., Merino-Ramos, T., Blázquez, A-B., Casas, J., Escribano-Romero, E., Sobrino, F. and Saiz, J.C. *J. Virol.* **88**(20), 12041-54 (2014).

Protection of a Single Dose West Nile Virus Recombinant Subviral Particle Vaccine against Lineage 1 or 2 Strains and Analysis of the Cross-reactivity with Usutu Virus. Martín-Acebes, M.A., Blázquez, A.B., Merino-Ramos, T., Escribano-Romero, E., Cañas, R., Pérez, P., Mateu, M-G. Sobrino, F. and Saiz, J.C. *PLoS ONE* **9**(9):e108056. (2014).

Membrane topology and cellular dynamics of foot-and-mouth disease virus 3A protein. González-Magaldi, M., Martín-Acebes, M., Kremer, L. and Sobrino, F. *PLoS ONE*. **9**(10): e106685. (2014).

J.C. Saiz, F. Sobrino, N. Sevilla, V. Martín, C. Perales and E. Domingo. Molecular and evolutionary mechanisms of viral emergence. In *Viral Infections and Climate Change*. pp.297-325. ISBN 978-1-118-29787-2. S.K. Singh (ed.). John Wiley & Sons (2014).

Premios / Awards

- III Premio Isabel Mínguez Tudela a la Innovación en Sanidad Animal. Plataforma Tecnológica Española de Innovación en Sanidad Animal (Vet+i). 2014. Vacuna peptídica sintética para la protección contra la Fiebre aftosa D. Andreu (UPF), E. Blanco (CISA-INIA) y F. Sobrino (CBMSO).

- Diploma del CSIC por méritos científicos durante el curso académico 2013-2014.

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 López

Resumen de investigación

Durante estos dos últimos años hemos continuado estudiando cómo la estructura del mRNA afecta a la iniciación de la traducción, empleando sobre todo modelos de mRNA viral, y combinando técnicas estructurales, genéticas y bioinformáticas. Hemos descrito molecularmente cómo la estructura del mRNA (DLP) de Alphavirus encalla en una región del ribosoma 40S durante la iniciación, permitiendo que el codón de iniciación se sitúe en el sitio P del ribosoma de un modo independiente de eIF2. De este modo, estos virus son capaces de traducir de una manera independiente de eIF2, un aspecto relevante en la interacción virus-hospedador que puede tener importantes implicaciones en evolución viral. En este sentido, estamos desarrollando un programa de evolución virtual que genera estructuras de RNA del tipo DLP mediante evolución molecular, y que cuya capacidad predictiva estamos evaluando mediante comparación con datos reales de evolución de Alphavirus en células de cultivo.

Nuestros datos indican que estos mRNAs virales, y probablemente el resto de mRNAs celulares, penetran en el ribosoma atravesando la región ES6S antes de alcanzar el canal donde se descodifica el mensaje. Precisamente en esta región hemos detectado a la principal RNA helicasa del complejo (eIF4A), lo que sugiere que la región E6SS del ribosoma 40S expuesta al solvente constituye el sitio de entrada y desenrollamiento del mRNA durante el proceso de scanning. En la actualidad estamos evaluando el papel de esta región en la traducción *in vivo*.

Nuestro interés último es conocer la contribución de la topología del ribosoma, la estructura del mRNA y el papel de algunos factores de iniciación alternativos de la célula (eIF1A y eIF2D) en el proceso de traducción global y específico de mensaje, sobre todo durante la respuesta al estrés. En este sentido, nuestro grupo a promovido, junto a otros grupos del CBMSO, la creación de un consorcio científico (Stress_Lab) que persigue abordar estas cuestiones desde un punto de vista global e integrado.

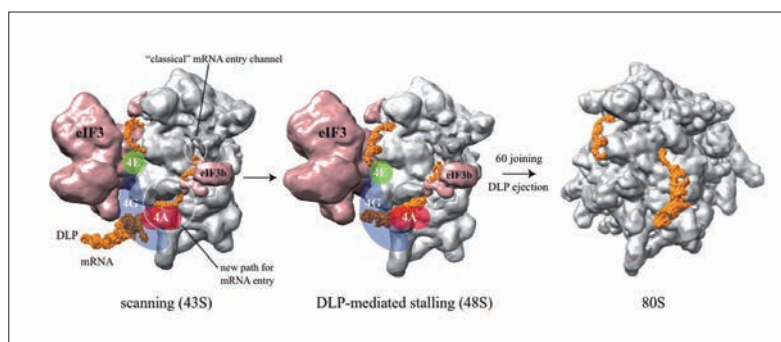


Figura 1. Modelo para la iniciación de la traducción del mRNA de Alphavirus. El mRNA penetra en el ribosoma 40S a través de la región ES6S, de modo que la estructura secundaria en el mRNA (DLP) es lo suficientemente estable como para encallar en esta región, trabando el avance del ribosoma y posicionando el AUGi en el sitio P. Según este modelo, el complejo eIF4F (4E en verde, 4G en azul y 4A en rojo) se situaría en esta región. Una vez que el complejo de iniciación 48S se establece, la entrada de la subunidad 60S induce cambios conformacionales en la región ES6S que permiten la eyección de la estructura DLP y el inicio de la etapa de elongación.

Figure 1. A model for translation initiation of Alphavirus mRNA. The mRNA penetrates the 40S ribosome through the ES6S region, so that the secondary structure of mRNA (DLP) is stable enough to get trapped in this region. This locks the advance of 40S ribosome so as to place the AUGi in the P site. According to this model, the eIF4F complex (4E in green, 4G in blue and 4A in red) would be acting on this region. Once the 48S is formed, the joining of 60S subunit triggers conformational changes in ES6S that promote DLP ejection and 80S assembly.

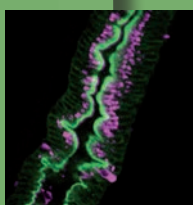
Research summary

In the last two years, we have continued to study how the mRNA structure is regulating translation initiation using viral mRNAs as models, and by combining structural, genetic and bioinformatic approaches. We recently found that mRNA structure (DLP) of Alphavirus becomes trapped in the solvent side of 40S ribosome during translation initiation, an event that allows the placement of AUG codon in the P site of ribosome in an eIF2-independent manner. Thus, these viruses can efficiently translate their mRNAs in the presence of phosphorylated eIF2, an important aspect of virus-host interaction with implications in viral evolution and adaptation. In this regard, we are developing a computer programme able to create and select new variants of RNA sequences that fold giving raise DLP-like structures. The predictive power of this programme will be tested by comparing the virtual data with those from real evolution experiments of Alphaviruses in cultured cells.

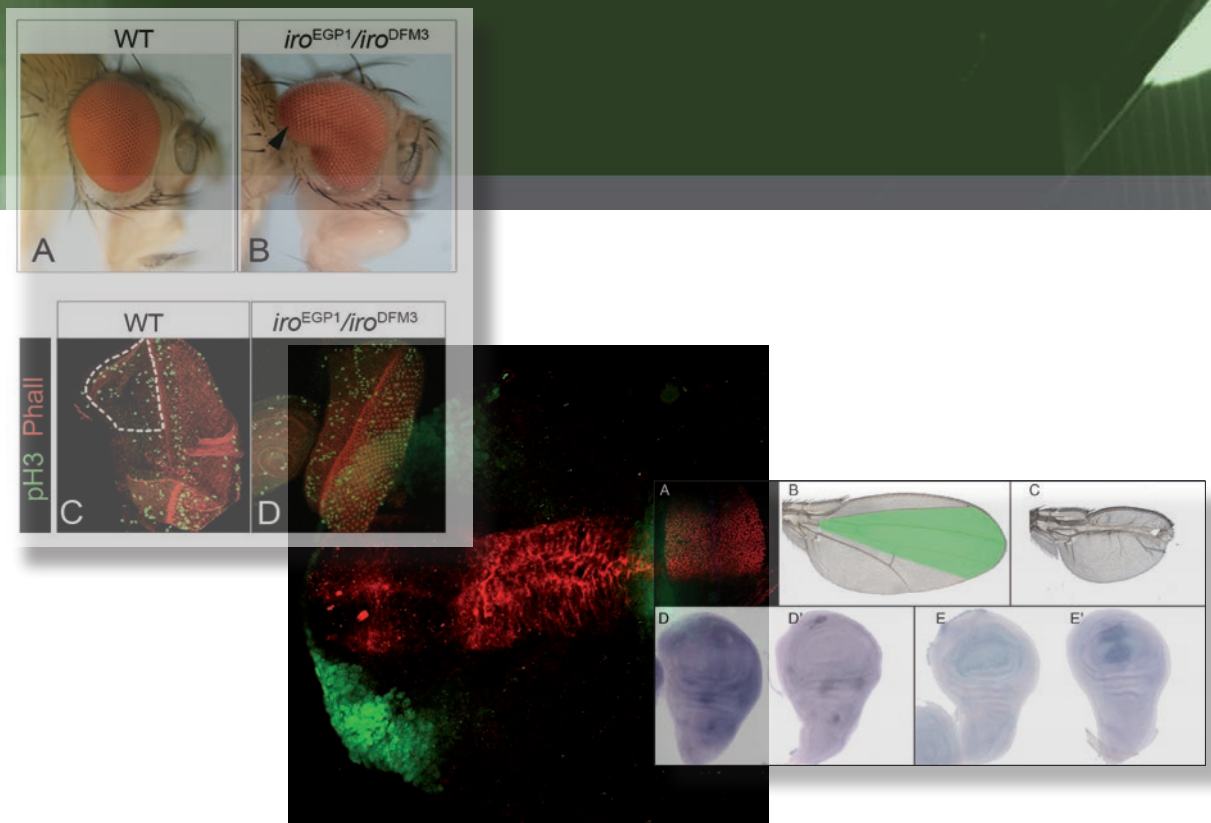
Our data show that these viral mRNAs, and probably the rest of host mRNAs, penetrate the 40S ribosome by passing through the ES6S region of solvent side before reaching the mRNA channel. In this region, we have detected the presence of main helicase of 48S complex (eIF4A), suggesting that the ES6S region is the gateway and the first region involved in the unwinding of mRNA.

Our goal is to understand the role that 40S ribosome topology, mRNA structure and some initiation factors (eIF2A and eIF2D) are playing in the control of protein synthesis at both global and message-specific levels. Thus, our group is promoting a joint venture with other labs at the CBMSO (Stress_lab) aimed to address these topics in an integrated way.

- 92 Función de las rutas de señalización Intercelulares en el control de la proliferación celular y la regeneración
Function of signalling pathways in the control of cell proliferation and organ regeneration
ANTONIO BAONZA CUENCA
- 94 Morfogénesis y Diferenciación del Sistema Nervioso de Vertebrados
Morphogenesis and Differentiation of the Vertebrate CNS
PAOLA BOVOLENTA NICOLAO
- 96 Regulación epigenética de la expresión génica durante el desarrollo de *Drosophila*
Epigenetic regulation of gene expression during Drosophila development
ANA MARÍA DE BUSTURIA JIMENO
- 98 Base molecular y celular de la organogénesis en *Drosophila*
Molecular and cellular basis of Drosophila organogenesis
SONSOLES CAMPUZANO CORRALES
- 100 Análisis de la señalización celular durante el desarrollo de epitelios en *Drosophila melanogaster*
Analysis of signalling pathways directing epithelial development in Drosophila
JOSÉ F. DE CELIS
- 102 Mecanismos de señalización en el desarrollo
Signaling mechanisms in development
ISABEL GUERRERO VEGA
- 104 Especificación de destinos celulares en el desarrollo del sistema nervioso central
Cell fate specification in the development of the central nervous system
FERNANDO JIMÉNEZ DÍAZ-BENJUMEA
- 106 Laboratorio de polaridad epitelial
Epithelial polarity laboratory
FERNANDO MARTÍN BELMONTE
- 108 Control genético de la morfogénesis en *Drosophila*
Genetic control of morphogenesis in Drosophila
GINÉS MORATA PÉREZ
- 110 Genética del desarrollo de derivados mesodérmicos en *Drosophila*: sistemas muscular y de filtración
Developmental biology of mesoderm derivatives: muscular and filtration systems
MAR RUIZ GÓMEZ
- 112 Especificación segmental y formación de patrón en *Drosophila*
Segmental specification and pattern formation in Drosophila
ERNESTO SÁNCHEZ-HERRERO ARBIDE



DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN



Development and Differentiation

Función de las rutas de señalización Intercelulares en el control de la proliferación celular y la regeneración

Function of signalling pathways in the control of cell proliferation and organ regeneration



Jefe de Línea / Group Leader:
Antonio Baonza Cuenca

Personal Científico /
Scientific Staff:
Antonio García-Bellido
(Ad Honorem)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Sandra Díaz García
Irene Andrade Zapata
Sergio Benjamín Velarde Rangel

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Javier Barrio Pérez
Sara Ahmed de Prado
Valentina Piras

Resumen de investigación

Uno de los procesos fundamentales en el control del crecimiento de un tejido es la regulación de la proliferación celular a través de señales intercelulares. La función de estas rutas es fundamental para el control de la proliferación celular durante el desarrollo normal, mientras que la alteración de su función puede dar lugar al desarrollo de distintos tumores. Uno de nuestros objetivos es identificar los mecanismos por los cuales dos de las vías de señalización más implicados en el desarrollo de tumores, y en el control del crecimiento, las vías de Notch y EGFR, regulan la mitosis y la proliferación celular. Para ello, utilizamos como modelo biológico los discos imaginales de *Drosophila*. Hay muchos precedentes que demuestran la utilidad de usar *Drosophila* como un organismo modelo para establecer los detalles mecanísticos de distintos procesos celulares que pueden ser extrapolados a otros organismos.

Otro de los proyectos del laboratorio es entender cómo un organismo puede reemplazar órganos o partes de sus cuerpos eliminados o dañados. Esta capacidad, conocida como regeneración, se conserva entre diferentes phyla, incluyendo *Drosophila*. ¿Por qué la regeneración tiene lugar en algunos animales, pero no en otros? ¿Por qué el mismo órgano tiene diferente capacidad regenerativa a lo largo del desarrollo? Estas son algunas cuestiones aún sin resolver. Para responder a algunas de estas preguntas es necesario obtener una mejor comprensión de los procesos genéticos y celulares que operan durante la regeneración. La importancia del estudio de la regeneración no sólo radica en el descubrimiento de los mecanismos que regulan este proceso, sino también en las posibles aplicaciones terapéuticas en medicina regenerativa que se puedan derivar de estos estudios. Para profundizar en los mecanismos genéticos implicados en la regeneración de extremidades y los ojos utilizamos *Drosophila melanogaster* como modelo biológico.

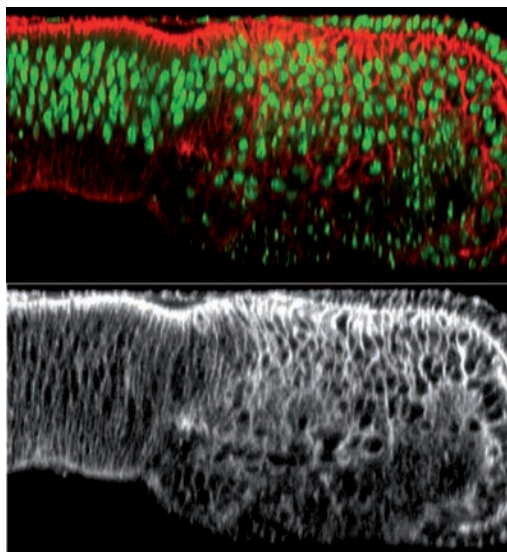


Figura 1. Disco imaginal sobrecrecido como consecuencia de la expresión de una forma activada de Moesina.

Figure 1. Overgrowth of an imaginal wing discs caused by the ectopic expression of an activated form of Moesin.

Research summary

One of the principal aspects of tissue growth is the regulation of cell proliferation by intercellular signals. Since it is well established that control of cell proliferation during development depends on these signals, and that their disruption underlies a large proportion of human tumours, it is fundamental to understand the mechanisms through which intercellular signal control cell cycle and cell proliferation. One of our goals is to identify the mechanism by which two of the signalling pathways most implicated in cancer and growth control, the Notch and EGFR pathways, regulate mitosis and cell proliferation. To this end we use an especially powerful and amenable genetic system – the developing *Drosophila* imaginal discs. There are many important precedents to demonstrate the utility of using *Drosophila* as a model organism in which mechanistic details of cellular control processes can be established and then translated into other organisms.

Other of the project of the lab is to understand how an organism can replace missing organs or portions of their bodies after injuries. This capacity, known as regeneration, is conserved among different phyla, including *Drosophila*. Why does regeneration take place in some animals but not in others? Why does the same organ have different regenerative capacity in different developmental times? These are unresolved issues, and for answering some of these questions is necessary to gain a better understanding of the genetic and cellular processes that operate during regeneration. The importance of the study of regeneration lies not only in discovering the mechanisms that regulate this process, but also for potential therapeutic applications in regenerative medicine. To gain insights into the genetic mechanisms involve in limb and eye regeneration we use *Drosophila melanogaster* as a biological model.

Publicaciones / Publications

Andrade-Zapata I, Baonza A. (2014) The bHLH factors extramacrochaetae and daughterless control cell cycle in *Drosophila* imaginal discs through the transcriptional regulation of the Cdc25 phosphatase string. *PLoS Genet.* Mar 20;10(3):e1004233.

Díaz-García S, Baonza A. (2013) Pattern occurs independently of cell division during *Drosophila* wing disc regeneration *in situ*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(32):13032-7.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Beatriz Pérez San Juan (2013). Título : Papel de la serina/treonina Quinasa *altered disjunction (ald)* en la regulación de la integridad epitelial y progresión tumoral. Universidad Autónoma de Madrid. Director Antonio Baonza.

Sandra Díaz García (2013). Título : Análisis del proceso de regeneración *in situ* en los discos imaginarios de *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Director Antonio Baonza.

Irene Andrade Zapata (2014). Título : Función de las proteínas de la familia bHLH Daughterless y Extramacrochaetae en el control de la proliferación y el ciclo celular de *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Director Antonio Baonza.

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
Florenca Cavodeassi Madarro
Beatriz Cubelos Álvarez

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Raquel Marco Ferreres
(Hasta Sept 2013)

Luisa Sánchez Arrones
Thomas DiMeglio Martelly
Fabiana Di Marco

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Marcos Cardozo Ruiz
Inmaculada Crespo Galán
(Hasta Dic 2013)

Lara Durán Trío
Francisco Javier Nieto López

Javier Rueda Carrasco
Tania Moreno Mármol (Sept 2014)
Miriam Sanz Rodríguez
Inés Mateo Ruiz (Sept 2014)

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
M^a Jesús Martín Bermejo
África Sandoñis Consuegra
Noemí Tabanera Anguita

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Raquel Toribio
Beatriz Duque
Mario Ledesma Tarrancon
Pedro Herrero Vidal
Diego Sese
Juan Ramón Perea Úbeda-Portugués
Maria Hernández Bejarano

Científicos Visitantes / *Visiting Scientists:*
Jessica Bertolini
Malte Lehemann

Resumen de investigación

Nuestro grupo investiga los mecanismos que controlan el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados, centrándose principalmente en el sistema visual y en aquellos aspectos que puedan ayudar a determinar las causas de malformaciones congénitas neurales o que están relacionadas con la patogénesis de enfermedades del Sistema Nervioso. Partiendo del concepto que la morfogénesis y la especificación celular durante la embriogénesis son procesos altamente coordinados, en este periodo hemos elucidado parte de las redes génicas que regulan la regionalización del prosencéfalo así como su relación con procesos de cohesión celular mediados por vía de señalización, como aquellas activadas por Wnt o Efrinas. Para estos estudios hemos utilizado el pez cebra y medaka como modelos experimentales. Hemos también contribuido a identificar la función de algunos miRNA en el desarrollo del sistema visual, y a desarrollar un modelo en pez medaka para el estudio de MLS (microphthalmia with skin lesions), estableciendo un mecanismo molecular para esta enfermedad rara. Además, hemos demostrado una nueva función para Boc y Cdon, dos moléculas de adhesión capaces de unir el morfógeno Shh. Nuestros estudios indican que durante el desarrollo ocular, Boc y Cdon se localizan predominantemente en la parte basal del neuroepitelio, el que correlaciona con una mayor extensión del pie basal y su enriquecimiento en extensiones tipo filopodios. En su localización basal, Boc y Cdon, actúan como “Shh decoy receptors”, contribuyendo así a limitar la función de este morfógeno. Por otro lado, en un proyecto en colaboración con otros miembros del CIBERER hemos contribuido a esclarecer las bases moleculares de la Enfermedad de Lafora, una enfermedad rara que lleva a neurodegeneración. También en relación a mecanismos patogénicos, hemos demostrado que niveles elevados de RRas2, un miembro de la super-familia de GTPasas de bajo peso molecular, correlacionan con la formación de tumores cerebrales en humanos.

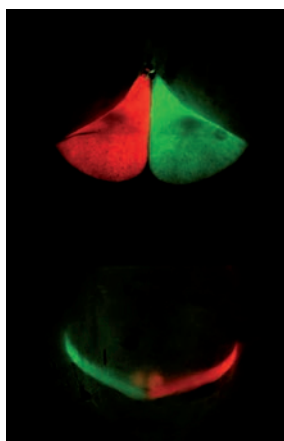


Figura 1. Vías visuales de ratón marcadas con trazadores fluorescentes: tracto óptico (abajo), colículo superior (arriba).

Figure 1. Mouse visual pathway highlighted with fluorescent tracers: optic tract (bottom); superior colliculus (top)

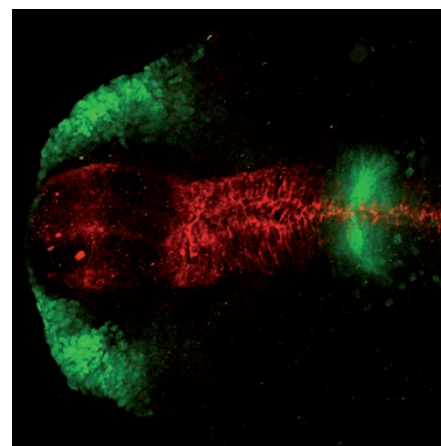


Figura 2. Visión dorsal de un embrión de pez cebra inmunotefido con anticuerpos contra Shh (rojo) y el factor de transcripción pax2 (verde).

Figure 2. Dorsal view of a zebrafish embryo immunostained with antibodies against the morphogen Sonic hedgehog (red) and the transcription factor pax2 (green).

Research summary

Our group investigates the 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 neural malformations or those related to the onset of neurological diseases. On the basis of the idea that morphogenesis and tissue patterning are highly coordinated events, during this period we have elucidated part of the gene regulatory networks involved in the subdivision of the forebrain and their relationship with cell cohesion events mediated by signalling pathways, such as those activated by Wnt ligands or Ephs/Ephrins. For these studies we took advantage mostly of zebrafish and medaka fish as experimental models. We have also contributed to identify the role of a few miRNA in eye development and to develop a model in medaka fish for MLS (microphthalmia with skin lesions), pinpointing to the molecular mechanism underlying this rare hereditary disease. Furthermore, we have identified a new role for Boc and Cdon, two cell adhesion molecules that bind the morphogen Shh. During eye development these two molecules are mostly localised to the basal end-foot of neuroepithelial cells favouring the enlargement of the basal side and the formation/stabilization of filopodial-like processes. In the basal-end-foot, Cdon and Boc act as Shh decoy receptors, limiting the effects of this morphogen. On another side, we have collaborated with other members of the CIBERER, to elucidate the molecular basis of Lafora Disease, a rare and neurodegenerative disease. Still related with pathogenic mechanisms, we have demonstrated that elevated levels of RRas2, a member of the low molecular weight GTPase superfamily, correlate with the development of brain tumours in humans.

Publicaciones / Publications

Beccari L., Marco-Ferreres, R and Bovolenta P. (2013) The logic of Gene Regulatory Networks in early vertebrate forebrain patterning. *Mech. Dev.* **130**, 95-111. (cover caption article).

Indriani, A., Conte, I., Chesi, GC, Quartararo, J., Cermola M, Tate, R., Ghezzi, D., Zeviani M, Goffrini, P., Ferrero, I., Bovolenta, P., and Franco, B. (2013) The impairment of HCCS leads to MLS syndrome by activating a non-canonical cell death pathway in the brain and eyes. *EMBO Mol Med.* **5**, 280-293. (cover caption article).

Ferri A., Favaro R.*, Beccari L*, Bertolini J., Tosetti V., Verzeroli C., Nieto-Lopez, F., Mercurio S., La Regina, F., Ottolenghi S., Bovolenta P. and Nicolis, S.K. (2013) Sox2 is required for embryonic development of the ventral telencephalon through the activation of the ventral determinants Nkx2.1 and Shh. *Development* **140**, 1250-1261.

Conte I. Banfi S and Bovolenta P. (2013) Noncoding RNAs in the development of sensory organs and related diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**:4141-4155.

Sanchez-Arrones, L.*, Nieto-Lopez, F.*, Sanchez-Camacho, C, Carretero MI, Herrera, E, Okada, A Bovolenta, P. (2013) Shh/Boc signaling is required for sustained generation of ipsilateral-projecting ganglion cells in the mouse retina. *J. Neurosci.* **33**, 8596-607 (Featured article).

Gutierrez-Erlandsson S, Herrero-Vidal P, Fernandez-Alfara M, Hernandez-Garcia S, Gonzalo-Flores S, Mudarra-Rubio A, Fresno M, Cubelos B. (2013) R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system. *Mol. Cancer* **23**,127-.

Gayarre J*, Duran-Trío, L.*, Criado Garcia O.*, Aguado C, Juana-López L., Crespo I., Knecht E., Bovolenta P. and Rodríguez de Córdoba S. (2014) The glycogen phosphatase activity of laforin is dispensable to rescue the Lafora disease phenotype of Epm2a^{-/-} mice. *Brain* **137**, 806-18. (Comment in Brain 137, 646-648).

Conte I, Merella S., Garcia Manteiga JM, Migliore C., Lazarevic D., Carrella S, Marco-Ferreres R., Avellino R., Emmett W., Sanges R., Bockett N., Van Heel D., Meroni G., Bovolenta P., Banfi S., Stupka E. (2014) The combination of transcriptomics and informatics identifies pathways targeted by miR-204 during neurogenesis and axon guidance. *Nuc. Acid Res.* **42**, 7793-806.

Cardozo M., Sánchez-Arrones L., Sandonis A., Sánchez-Camacho C., Gestri G., Wilson SW, Guerrero, I. and Bovolenta P. (2014) Cdon acts as a Hedgehog decoy receptor during proximal-distal patterning of the optic vesicle. *Nature Comm.* **5**:4272. doi: 10.1038/ncomms5272. (Selected in The Faculty of 1000).

Cavodeassi F (2014). Adhesive/repulsive codes in vertebrate forebrain morphogenesis. *Symmetry* **6**, 704-721.

Cavodeassi F (2014). Integration of anterior neural plate patterning and morphogenesis by the Wnt signaling pathway. *Dev Neurobiol* **74**, 759-771.

Cavodeassi F and Bovolenta P. (2014) New functions for old genes: Pax6 and Mitf in eye pigment biogenesis. *Pigment Cell & Melanoma Res.* **27**, 1005-1007.

Bovolenta, P., Gorny, A., Esteve P. and Steinbeisser, H. (2014). Secreted Wnt inhibitors or modulators. Chapter 13 in "Wnt Signaling in Development and Disease: Molecular Mechanisms and Biological Functions. Stefan Hoppler and Randall T Moon, Editors.

Cavodeassi F*, Ivanovitch K and Wilson SW (2013). Eph/Ephrin signalling maintains the segregation of eye field cells from adjacent neural plate territories during forebrain morphogenesis. *Development* **140**, 4193-4202. *Corresponding author.

Ivanovitch K, Cavodeassi F* and Wilson SW* (2013). Precocious acquisition of neuroepithelial character in the eye field underlies the onset of eye morphogenesis. *Dev Cell* **27**, 293-305. *Corresponding author.

Otras actividades / Other activities

Nuestro grupo pertenece a Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).

Our group belongs to the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER)

Organización del "8th European zebrafish meeting" (Barcelona, 9-13 de Julio de 2013).

Organization of the "8th European Zebrafish Meeting" (Barcelona, 9-13 July, 2013).

Organización del Simposio Internacional Fundación Ramón Areces: Building up the brain: new interdisciplinary perspectives to understand and treat brain diseases. Madrid, 15-17 de Octubre, 2013.

Organization of the International Symposium Fundación Ramón Areces "Building up the brain: new interdisciplinary perspectives to understand and treat brain diseases" (Madrid 15-17 October, 2013).

Organización de la Jornada "From Development to Disease: congenital malformations of the eye and their impact on visual function". CIBERER y CBMSO, Madrid, 28 de Abril, 2014.

Organization of the Symposium "From development to disease: congenital malformations of the eye and their impact on visual function" CIBERER and CBMSO, Madrid 29th April, 2014

Organización local del X Congreso de la Sociedad Española de Biología del Desarrollo. Madrid, 13-15 de Octubre de 2014).

Local Organization of the Xth Meeting of the Spanish Society of Developmental Biology (Madrid, 13-15 October, 2014).

Organización del Workshop: Current Trends in Biomedicine: Proteases at work: cues for understanding neural development and neurodegeneration. Baeza, 20-22 de Octubre, 2014.

Organization of the Workshop Current Trends in Biomedicine "Proteases at work: cues for understanding neural development and neurodegeneration" (Baeza, 20-22 October 2014).

Participación en actividades de difusión científica (Semana de la ciencia 2013-2014 y Finde científico 2014).

Participation in science outreach activities (Semana de la Ciencia 2013-2014 and "Finde Científico 2014").

Artículo de divulgación: Investigar entre todos: Hacia la identificación de factores que podrían contribuir a la recuperación funcional de la Retinitis Pigmentosa. 2013. *Visión*, **42**, 12-16.

Science communication article: "Investigar entre todos: hacia la identificación de factores que podrían contribuir a la recuperación funcional de la Retinitis Pigmentosa". 2013. *Visión*, **42**, 12-16.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Marcos Cardozo (2013). The Shh binding protein Cdon is required for patterning and morphogenesis of the vertebrate eye. 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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Ricardo Aparicio Crespo
Rocío Simón Sacristán
Sol Fereres Rapoport

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Carolina Simoes da Silva Pereira
Chidiebere Uzodinma Awah
Carlos Molina Bengochea
Julia Díaz Díaz
Raquel Álvarez Ocaña

Resumen de investigación

La investigación que se realiza en mi laboratorio está 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 nuestros estudios nos pueden llevar a un mas profundo entendimiento de los mecanismos que controlan la génesis y la progresión de las enfermedades humanas.

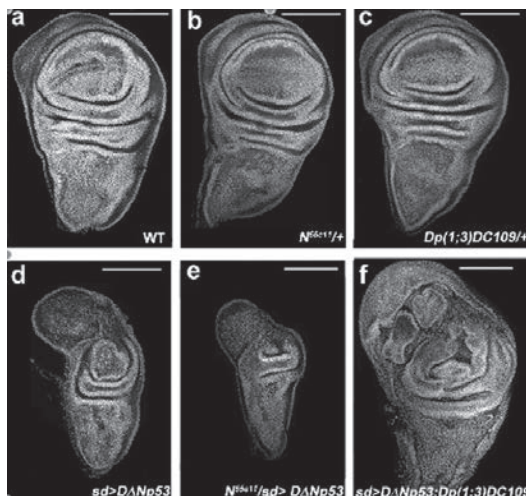


Figura 1. La proliferación inducida por Dp53 es dependiente de los niveles de expresión de *Notch*. a-f discos imaginales de ala de los genotipos que se indica teñidos con TO-PRO-3. La proliferación de los discos imaginales no se afecta por la ausencia de una dosis del gen *Notch* (b) ni la presencia de una dosis extra de *Notch* (c) cuando se compara con wt (a). Sin embargo, la ausencia de una dosis de *Notch* (e) o la presencia de una dosis extra de *Notch* influye en la proliferación inducida por los altos niveles de Dp53 (c).

Figure 1. Dp53-induced proliferation is dependent on *Notch* levels of expression. a-f wing imaginal discs of the genotypes indicated stained with TO-PRO-3. The proliferation of the wing imaginal cells is not affected by the absence of one dose of *Notch* gene (b) or by the presence of an extra-dose of *Notch* (c) when compared to wt (a). However, the absence of one dose of *Notch* (e) or the presence of an extra-dose of *Notch* dramatically affect the proliferation induced by high levels of Dp53 (c).

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

Fereres, S., Simón, R., Mohd-Sarip, A., Verrijzer, CP., Busturia, A (2014) dRYBP counteracts chromatin-dependent activation and repression of transcription. *PLoS One* Nov 21;9(11):e113255.

Aparicio, R, Simoes da Silva, C., Busturia A (2014) The microRNA mir-7 contributes to the control of *Drosophila* wing growth. *Developmental Dynamics*. Jan;244(1):21-30.

Simón, R., Aparicio, R., Houdsen, B., Bray, S., Busturia, A (2014) *Drosophila* p53 controls Notch expression and balances apoptosis and proliferation. *Apoptosis* 19 (10) 1430-43.

Fereres, S., Simón, R, Busturia, A (2013) A novel dRYBP-SCF complex functions to inhibit apoptosis in *Drosophila*. *Apoptosis* 18, (12) 1500 -1512.

Aparicio, R., Neyen, C., Lemaitre, B., Busturia, A. (2013) dRYBP contributes to the negative regulation of *Drosophila* IMD pathway. *PLoS One* Apr 15;8 (4): e62052.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Rocio Simón Sacristán (2013). PhD Thesis. Función de las proteínas Polycomb/trithorax y Dp53 en la regulación de la expresión génica de *Drosophila*. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid, Spain. Supervisor: Ana Busturia.

Sol Fereres Rapoport (2014). PhD Thesis. dRYBP transcription-dependent and transcription-independent functions in *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid, Spain. Supervisor: 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

Doctor vinculado / Ad Honorem
Juan Modolell Mainou

Personal Científico /
Scientific Staff:
Isabel Rodríguez Enríquez
(Hasta julio 2013)

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Natalia Barrios López
Esther González Pérez
Anabel Rodríguez Learte
(Hasta septiembre 2013)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Eva Revilla Yates
(Hasta julio 2014)
Alvaro Román Fernández
(Hasta agosto 2014)

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Rosario Hernández Baeza

Resumen de investigación

La organogénesis conlleva la especificación dentro de los campos morfogenéticos (tales como son los discos imaginales de *Drosophila*) de territorios capaces de adquirir diferentes destinos y en los cuales se establecen patrones característicos de elementos morfológicos. La especificación territorial y la formación de patrones están acopladas a un control muy estricto de la proliferación celular. Hemos identificado dos nuevos reguladores de la proliferación celular en *Drosophila*: las homeoproteínas del complejo Iroquois y la proteína quinasa aPKC y estamos analizando su mecanismo de acción.

Las proteínas Iroquois restringen la proliferación celular (Figuras 1 y 2) por un mecanismo independiente de la regulación transcripcional. Hemos determinado que la interacción física de la proteína Iroquois Caupolican con complejos proteicos que contienen Ciclina E, principalmente a través de su dominio Iro-Box, reduce la actividad del complejo Ciclina E/Cdk2 ralentizando el paso de G1 a S en el ciclo celular. Las proteínas Iroquois (Irx en vertebrados) desempeñan un papel clave, evolutivamente conservado, en la especificación territorial. Nuestros resultados indican que, además, son capaces de regular el tamaño de los territorios que especifican y sugieren un mecanismo molecular para la función de los genes *Irx* como genes supresores de tumores.

Hemos observado que la sobre-expresión de una forma constitutivamente activa de aPKC incrementa la proliferación celular en los discos imaginales, en parte por desregulación de las vías de señalización de Hippo y de Notch. Estamos analizando hasta que punto la falta de polaridad ápico-basal asociada a la pérdida o ganancia de función de aPKC, su papel en el tráfico intracelular y/o su actividad como proteína quinasa, contribuyen a la desregulación de estas vías.

Hemos llevado a cabo, además, un análisis estructura-función de la cadherina atípica Dachshous, un regulador de la actividad de numerosas vías de señalización entre ellas la de Hippo.

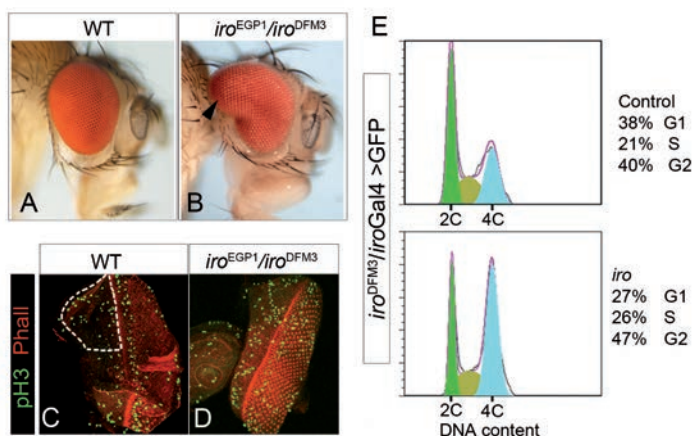


Figura 1. La falta de función de los genes del complejo Iroquois causa el sobre crecimiento de la parte dorsal del ojo (A, B), debido a un incremento de la proliferación celular (C-E).

Figure 1. Loss-of-function of Iroquois complex genes causes overgrowth of the dorsal part of the eye (A, B), due to increased cell proliferation (C-E).

Research summary

Organogenesis entails the specification within the developmental fields (such as the *Drosophila* imaginal discs) of territories with the ability to acquire different fates and that display characteristics patterns of morphological elements. Territorial specification and pattern formation are coupled to a strict control of cell proliferation. We have identified two novel regulators of cell proliferation in *Drosophila*: the homeoproteins of the Iroquois complex and the protein kinase aPKC and we are analyzing their mechanisms of action.

Iroquois proteins restrict cell proliferation (Figures 1 and 2) by a mechanism independent of transcriptional regulation. We have determined that the physical interaction of the Iroquois protein Caupolican with Cyclin E-containing complexes, mainly through its Iro-Box, reduces the activity of the Cyclin E/Cdk2 complex slowing-down the G1 to S transition of the cell cycle. Iroquois proteins (Irx in vertebrates) play a key role, evolutionarily conserved, role in territorial specification. Our results indicate that, in addition, they are able to regulate the size of the territories they specify and provide a molecular mechanism for the role of Iroquois/Irx genes as tumour suppressors.

Over expression of constitutively active aPKC increases cell proliferation in the imaginal discs, partly due to deregulation of the Hippo and Notch signalling pathways. We are analyzing to what an extent the loss of apical-basal polarity associated to the loss or gain-of-function of aPKC, its role in intracellular traffic and/or its protein kinase activity contribute to the deregulation of these signalling pathways

Furthermore, we have carried out a structure-function analysis of the atypical Cadherin Dachshous, a regulator of the activity of many signalling pathways, Hippo among them.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Alvaro Román Fernández (2014). Control de la proliferación celular y de la arquitectura tisular por el oncogén aPKC en los epitelios de *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Directora: Sonsoles Campuzano Corrales.

Eva Revilla Yates (2014). Análisis molecular y funcional de *dachshous* durante el desarrollo larvario de *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Directora: Isabel Rodríguez Enríquez

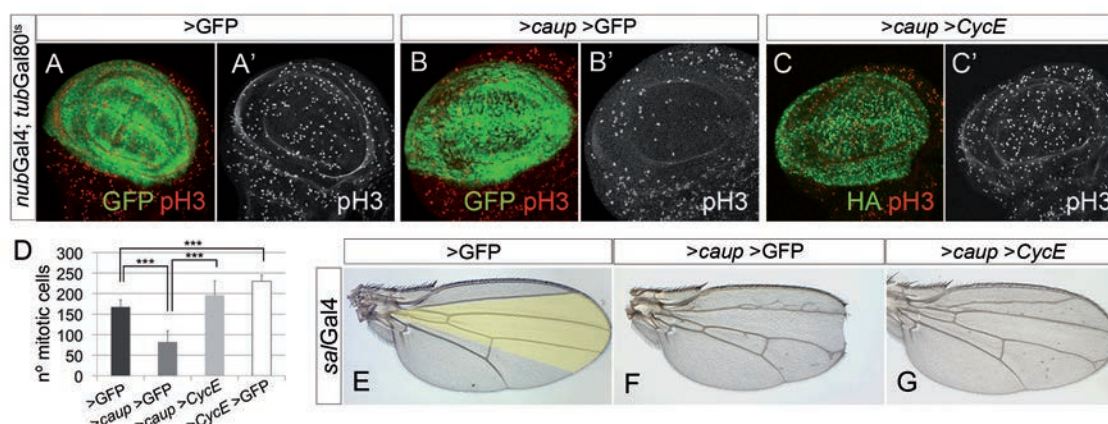


Figura 2. La sobre expresión de cualquier proteína Iroquois en el disco imaginal de ala ralentiza la división celular (A-B', D) y disminuye el tamaño del ala (E, F). Estos efectos se contrarrestan por la co-expresión de Ciclina E (C-D, G).

Figure 2. Over expression of any of the Iroquois proteins in the wing imaginal disc slows down cell proliferation (A-B', D) and reduces the size of the wing (E, F). These effects are counteracted by Cyclin E co-expression (C-D, G).

Análisis de la señalización celular durante el desarrollo de epitelios en *Drosophila melanogaster*

Analysis of signalling pathways directing epithelial development in *Drosophila*



Jefe de Línea / Group Leader:
José F. de Celis

Personal Científico /
Scientific Staff:
Ana Ruiz Gómez
Ana López Varea

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Carlos Estella Sagrado
(Ramón y Cajal; UAM)
Cristina Grande
(Ramón y Cajal; UAM)
Cristina Molnar-d'Arkos Muro
(Hasta Diciembre 2013)
María Fernández Organista
(Hasta Diciembre 2013)
David Requena Soria
(Desde Octubre 2014)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Mercedes Martín Fernández
Covadonga Fernández Hevia
Cristina Martínez Ostalé
(Desde Octubre 2013)
Marta Truchado García
Sergio Cordoba Casado
Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Nuria Esteban Delgado
Estudiantes /
Undergraduate Students:
Julia Faló Sanjuan

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 utilizar este tejido epitelial para entender la estructura, componentes, contribución e interacciones de diferentes rutas de señalización celular. Nuestra aproximación experimental incluye búsquedas genéticas utilizando técnicas de ARN-interferente, análisis genético de condiciones de falta y ganancia de función de los genes de interés, estudios inmunocito-químicos para conocer la expresión de estos genes así como describir los parámetros celulares de proliferación, viabilidad y dominios de señalización en condiciones mutantes. También utilizamos técnicas Bioquímicas y de Biología Molecular para identificar interacciones moleculares entre las proteínas de interés y estudiar la estructura de regiones reguladoras. Nuestros estudios han permitido definir nuevos componentes de las rutas de señalización de Notch, Insulina, Hedgehog y EGFR, así como identificar funciones y genes diana de la ruta de señalización TGF β y del factor de transcripción Spalt. El análisis llevado a cabo en *Drosophila* permitirá el estudio de estos genes en otros organismos donde sus funciones están relacionadas con el desarrollo normal y con 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 disfrutan de proyectos independientes y cuyas líneas de investigación consisten en el estudio de los procesos morfogenéticos que controlan el desarrollo de los apéndices y la regulación de la expresión génica durante la formación del ala de *Drosophila* (Dr. Carlos Estella), y el estudio de la definición de los ejes y asimetrías corporales y de los mecanismos que las generan (Dra. Cristina Grande).

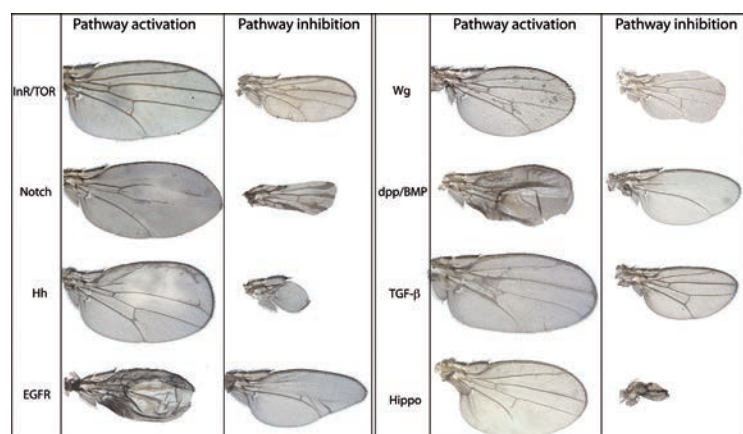


Figura 1. Fenotipo de alas en las que se ha manipulado la actividad de las rutas de señalización Insulina (InR/Tor), Notch (Notch), Hedgehog (Hh), Epidermal growth factor receptor (EGFR), Wingless (Wg), BMP (dpp/BMP), Transforming growth factor β (TGF- β) y Salvador/Warts/Hippo (Hippo), bien por activación ("Pathway activation") o por inhibición ("Pathway inhibition").

Figure 1. Wing phenotypes resulting from manipulations in the activity of the Insulin (InR/Tor), Notch (Notch), Hedgehog (Hh), Epidermal growth factor receptor (EGFR), Wingless (Wg), BMP (dpp/BMP), Transforming growth factor β (TGF- β) and Salvador/Warts/Hippo (Hippo) signalling pathways, either by activation ("Pathway activation") or by inhibition ("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. We use this epithelial tissue to understand the structure, components, contribution and interactions of different signalling pathways. Our experimental approach includes genetic screening using RNAi techniques, genetic analysis of loss- and gain-of-function conditions in the genes of interest and immunohistochemical studies to describe the expression of these genes and the cellular parameters of proliferation, viability and spatial domains of signalling in mutant conditions. We also use biochemical and molecular biology techniques to identify molecular interactions among the proteins of interest and to study the structure of their regulatory regions. Our work has allowed us to identify and to characterise novel components of the Notch, Insulin, Hedgehog and EGFR/Ras signalling pathways, as well as to identify the functions and transcriptional targets of the TGF β pathway and the transcription factor 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 to 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 the study of the morphogenetic processes controlling appendage development and the regulation of gene expression during wing development (Dr. Carlos Estella) and the study of the definition and generation of corporal axes and asymmetries in the body plan (Dra. Cristina Grande).

Publicaciones / Publications

Organista, M. F., de Celis, J. F. (2013). The Spalt transcription factors regulate cell proliferation, survival and epithelial integrity downstream of the Decapentaplegic signalling pathway. *Biology Open* **2**, 37-48.

Hevia, C. F., de Celis, J. F. (2013). Activation and function of TGF β signalling during *Drosophila* wing development and its interactions with the BMP pathway. *Dev. Biol.* **377**, 138-153.

de Celis, J. F., García-Bellido, A. (2013). Imaginal discs. Brenner's Encyclopedia of Genetics 2e, Chapter **769**, p 19-23. B978-0-12-374984-0.00769-5.

de Celis, J. F. (2013). Understanding the determinants of Notch interactions with its ligands. *Sci Signal.* **6**, pe.19.

Molnar, C., de Celis J. F. (2013) Tay Bridge is a negative regulator of EGFR signalling and interacts with Erk and Mkp3 in the *Drosophila melanogaster* wing. *PLoS Genet.* **9**:e1003982.

Publicaciones Dra. Cristina Grande (2013-2014):

Grande C, Martín-Durán JM, Kenny NJ, Truchado-García M, Hejnl A. (2014) Evolution, divergence and loss of the Nodal signalling pathway: new data and a synthesis across the Bilateria. *Int J Dev Biol.* **58**, 521-532.

Kenny NJ, Namigai EK, Dearden PK, Hui JH, Grande C, Shimeld SM. (2014) The Lophotrochozoan TGF- β signalling cassette - diversification and conservation in a key signalling pathway. *Int J Dev Biol.* **58**, 533-549.

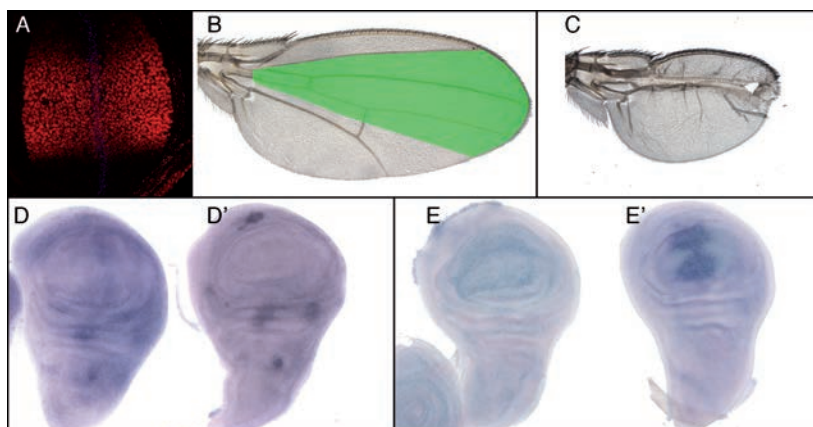
Osca D, Irisarri I, Todt C, Grande C, Zardoya R. (2014) The complete mitochondrial genome of *Scutopus ventrolineatus* (Mollusca: Chaetoder-momorpha) supports the Aculifera hypothesis. *BMC Evol Biol.* **14**, 197.

Publicaciones Dr. Carlos Estella (2013-2014):

Córdoba S, Estella C (2014) The bHLH-PAS transcription factor dysfunction regulates tarsal joint formation in response to Notch activity during *drosophila* leg development. *PLoS Genet.* **10** e1004621.

Figura 2. (A-B) Expresión de Spalt en el disco de ala (A, nucleos en rojo) y región equivalente en el ala adulta (sombreado verde en B). (C) Fenotipo de alas mutantes para Spalt. (D-E') Expresión de un gen activado por Spalt (D-D') y de un gen reprimido por Spalt (E-E') en discos imaginales de ala silvestres (D y E) y mutantes para *spalt* (D' y E').

Figure 2. (A-B) Expression of Spalt in the wing disc (A, red nuclei) and equivalent region in the adult wing (Green shadow in B). (C) Spalt mutant wing. (D-E') Expression of a gene activated by Spalt (D-D') and repressed by Spalt (E-E') in wild type wing discs (D and E) and in *spalt* mutant discs (D' and E').



Mecanismos de señalización en el desarrollo

Signaling mechanisms in development



Jefe de Línea / Group Leader:

Isabel Guerrero Vega

Investigador Asociado /

Research Associate :

Nicole Gorfinkel Haim

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:

Ana Citlali Gradilla Castellanos

Laura González Méndez

Sheila Jordan Álvarez

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

David Sánchez Hernández

Eleánor Simon

João Ramalho Ortigão-Farias

Irene Seijo Barandearán

Julia Duque Lloredo

Jaime Jurado Gómez

Adrián Aguirre Tamaral

Técnicos de Investigación /

Technical Assistance:

Carmen Ibáñez Pérez

M. Carmen Rodríguez-Navas

Vanessa Sánchez Vaquero

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Pau Pulido Company

Paloma Ozores Diez

Gustavo Aguilar

Resumen de investigación

La comunicación celular es un proceso clave durante el desarrollo; y su desregulación es una de las causas más frecuentes de malformaciones, trastornos neurológicos y el cáncer. Durante la diferenciación y crecimiento varias moléculas de señalización funcionan como mensajeros entre las células. Algunas de estas moléculas actúan como morfógenos. La distribución graduada de morfógenos y la capacidad de las células receptoras para responder específicamente a diferentes concentraciones de ligando tienen que ser procesos estrechamente regulados. Recientemente se ha propuesto que la señalización a larga distancia está mediada por citonemas o filopodios especializados. Nuestra hipótesis es que durante el desarrollo embrionario las células no neuronales intercambian proteínas señalizadoras mediante un contacto directo, de una forma similar a lo que sucede en los procesos sinápticos, facilitando así la concentración y la restricción espacial de la señal.

Para estudiar el papel de los citonemas en la señalización investigamos el gradiente de Hedgehog (Hh) en el disco de ala y en la epidermis abdominal de *Drosophila*. Hemos demostrado que los citonemas se requieren para el establecimiento de su gradiente morfogenético, y que los exosomas son los portadores Hh en el transporte y la secreción mediada por citonemas (Figura 1). Para la liberación de Hh en exosomas es necesario su reciclaje desde la membrana apical a la basolateral en las células productoras (Figura 2).

Aunque los citonemas se han implicado principalmente en la comunicación intercelular mediada por morfógenos, es posible que proporcionen un mecanismo general para la comunicación entre células en una amplia gama de procesos morfogenéticos. Así, hemos observado que durante el Cierre Dorsal (CD), un proceso morfogenético del embrión de *Drosophila* que tiene similitudes con los procesos de cicatrización, las células epiteliales forman este tipo de extensiones. El grupo de Nicole Gorfinkel se enfoca en el estudio de la coordinación celular durante este proceso, y en particular en la posible función de los citonemas en esta coordinación.

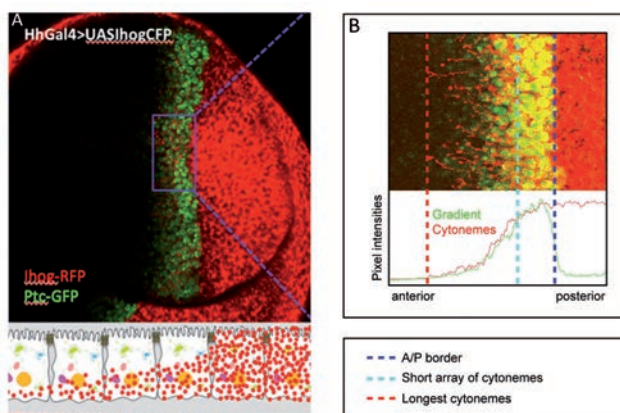


Figura 1. El gradiente de la señalización de Hh se correlaciona con la longitud y densidad de los citonemas a lo largo del eje anterior-posterior. A) Muestra el gradiente de Hh en el disco imaginal de ala con la expresión de lhog en las células del compartimento posterior (rojo) y las respuestas a Hh visualizado por la expresión de promotor de PTC::GFP en las células del compartimento anterior (verde). B) El panel superior muestra una fusión en Z de varios planos del mismo disco. El panel inferior muestra los perfiles gráficos, que representan las intensidades de los píxeles verticalmente promediados del gradiente (curva verde) y los citonemas (curva roja). Las dos curvas disminuyen de una manera similar.

Figure 1. Hh activity gradient correlates with the length and density of cytonemes along the anterior-posterior axis. A) Hh gradient in the wing imaginal disc by the expression of lhog in the P compartment cells (red) and the Hh responses by Ptc-promotor-trap::GFP (green) in the A compartment cells. B) The top panel shows a merge of Hh activity gradient (Ptc-promotor-trap::GFP) and cytonemes labeled with lhog-RFP. The bottom panel shows profile plots, which depict the vertically averaged pixel intensities along the horizontal axis of both gradient (green curve) and cytonemes (red curve). Both curves decline in a similar way.

Research summary

Cell-cell communication is a key event that occurs in a precise manner during normal development, and its misregulation causes diseases such as cancer, malformations and neurological disorders. During the regulation of differentiation and growth several signalling molecules function as messengers between cells. In some cases long-distance cell-cell signal communication is essential, and some of these signal molecules acts as morphogens. The graded distribution of morphogens and the ability of the receptor cells to respond specifically to different ligand concentrations have to be tightly regulated processes. It has recently been proposed that cytonemes or specialized filopodia mediate long-distant signalling. Our hypothesis is that during embryonic development non-neuronal cells exchange signalling proteins at sites of direct contact as in synaptic processes, promoting concentration and spatial restriction of a signal.

To study the role of cytoneme-mediated signalling we investigated Hedgehog (Hh) gradient formation in the wing disc and the abdominal epidermis of *Drosophila*. We have demonstrated that cytonemes are required for the establishment of a normal Hh morphogen gradient and that exosomes are the Hh carriers in cytoneme-mediated transport and secretion (Figure 1). For this release Hh has to recycle from the apical to the basolateral side of the epithelium (Figure 2).

Although cytonemes have been mostly implicated in the communication between cells mediated by morphogens, it is possible that cytonemes provide a general mechanism for inter-cellular communication across a wide range of morphogenetic processes. We have observed that during Dorsal Closure (DC), a morphogenetic process of the *Drosophila* embryo akin to wound healing processes, epithelial cells develop cytoneme-like structures. The group of Nicole Gorfinkiel studies how cells coordinate their activity during DC, with a particular focus on the role of cytonemes in this coordination.

Publicaciones / Publications

Bilioni, A., Sánchez-Hernández, D., Ibáñez, C., Callejo, A., Gradilla A.C., Mollica, E., Rodríguez-Navas, M.C., and Guerrero, I. (2013). Balancing Hedgehog, a retention and release equilibrium given by Dally, Ihog, Boi and shifted/DmWif. *Dev Biol.* **376**(2):198-212.

Gradilla A-C., and Guerrero I. (2013). Cytoneme-mediated cell-to-cell signaling during development. *Cell Tissue Res.* Apr;**352**(1):59-66.

Gradilla, A-C., Guerrero, I. (2013). Hedgehog on the move: a precise spatial control of Hedgehog dispersion shapes the gradient. *Curr Opin Genet Dev.* 2013 Aug;**23**(4):363-73.

Verbeni, M., Sánchez, O., Siegl-Cachedenier I, Carleton A, Guerrero, I.* Ruiz i Altaba, A.*, Soler, J.* (2013). Morphogen action through nonlinear-flux-limited spreading. *Phys Life Rev.* Jun 25.

Bischoff, M., Gradilla, A.C., Seijo, I., Rodríguez-Navas, C., and Guerrero, I. Cytonemes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. *Nature Cell Biol.* 2013 Nov;**15**(11):1269-81.

Gorfinkiel, N. Mechano-chemical coupling drives cell area oscillations during morphogenesis. 2013, *Biophys Journal* **104**: 1-3.

Verbeni M, Sánchez O, Mollica E, Siegl-Cachedenier I, Carleton A, Guerrero, I.* Ruiz i Altaba, A.*, Soler, J.* J. On flux- limited morphogenesis: reply to comments on Morphogen action through nonlinear-flux-limited spreading. *Phys Life Rev.* 2013 Oct 31.

Cardozo, M.C., Sánchez-Arrones, L., Sandonis, A., Sánchez-Camacho, C., Gestri, G., Wilson, S.W., Guerrero, I., and Bovolenta, P. Cdon acts as a Hh decoy receptor during proximal-distal patterning of the optic vesicle. *Nature Communication.* 2014 Jul 8;**5**:4272.

Machado, P.F., Blanchard, G.B., Duque, J. and Gorfinkiel, N. Cytoskeletal turnover and Myosin contractility drive cell autonomous oscillations in a model of *Drosophila* Dorsal Closure. 2014. *European Physics Journal*, **23** (7).

Fischer, S., Blanchard, G. B., Duque, J., Adams, R. J. Martinez Arias, A., Guest, S. D. and Gorfinkiel, N. Differential cell and tissue mechanical properties in epithelia with perturbed actomyosin dynamics. 2014. *PLOS one* **9** (4), e95695.

Gradilla, A-C., González, E., Seijo, I., Andrés, G., González-Méndez, L., Sánchez, V., Bischoff, M., Callejo, A., Ibáñez, C., Ortigão-Farias, J-R, Sutherland, J.D., González, M., Barrio, R., Falcón-Pérez, J-M, Guerrero, I. Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion. *Nature Communication.* 2014, Dec 4;**5**:5649.

Guerrero I, Rohatgi R. Editors. Frontiers in hedgehog signal transduction. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Sep;**33**:50-1.

Guerrero, I., Kornberg, T.B., Hedgehog and its circuitous journey from producing to target cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2014 Sep;**33**C:52-62.

Tesis doctorales / Doctoral theses

David Sánchez Hernández. Título; Papel de Ihog y Boi en la señalización de Hedgehog. Dirigida por Isabel Guerrero Vega. Defendida el 13 Enero 2014 en la Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

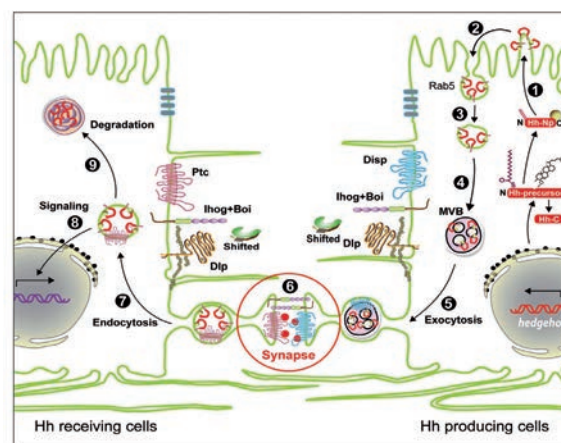


Figura 2. Modelo para el procesamiento de Hh, el tráfico, la liberación y la recepción en las células del disco imaginal del ala de *Drosophila*. Representaciones esquemáticas de los pasos de la producción, procesamiento, reciclaje y recepción de Hh. Estos pasos se enumeran desde una célula productora de Hh (panel derecho) a una célula receptora (panel izquierdo). (1) Transcripción, procesamiento, modificación lipídica y externalización apical de Hh; (2) La internalización mediada por (3) dinamina y Rab 5; (4) el reciclaje mediado por Rab 4, 8, 11 para la formación de los cuerpos multivesiculares; (5) la liberación y transporte mediada por citonemas. En este proceso varias moléculas se han identificado; Disp, Dlp, Ihog, Boi y Shf. (6) La recepción está mediada por citonemas y exovesículas. La recepción se lleva a cabo por el contacto célula-célula entre las células productoras y las receptoras de Hh de forma similar a un proceso sináptico. Ptc, Dlp, Ihog, Boi se requieren para la recepción. (7) La endocitosis del ligando y el receptor. (8) La transducción de señales y la activación de destino. (9) La degradación lisosomal.

Figure 2. Model for Hh processing, trafficking, release, and reception in the *Drosophila* wing imaginal disc cells. In these schematic representations of a Hh producing cell (right panel) and a Hh receiving cell (left panel), steps in Hh production, processing, movement and reception are depicted and enumerated. (1) Hh transcription, processing, lipid modifications and apical externalization; (2) internalization mediated by (3) dynamin and Rab 5; (4) recycling mediated by Rab 4, 8, 11 to form multivesicular bodies; (5) cytoneme-mediated release and transport. In this process several molecules has been identified; Disp, Dlp, Ihog, Boi and Shf. (6) The reception is mediated by cytoneme and exovesicles. The reception takes place by cell-cell contact between receiving and presenting cells similar to a synaptic process. Ptc, Dlp, Ihog, Boi are required for reception. (7) Endocytosis of the ligand and the receptor. (8) Signal transduction and target activation. (9) Lysosomal degradation.

Especificación de destinos celulares en el desarrollo del sistema nervioso central

Cell fate specification in the development of the central nervous system



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Fernando Jiménez Díaz-Benjumea

Personal Científico /
Scientific Staff:
Pilar Herrero Solans

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Alicia Estacio Gómez
Marta Moris Sanz

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Javier Álvaro Rivero

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Beatriz Fraile Méndez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Diego Zambrano
Miguel Martín González
Pablo Llevenés Martínez
Cristina López Roso

Resumen de investigación

En nuestro laboratorio investigamos el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) usando la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) como modelo experimental (Figura 1).

Actualmente estamos interesados en dos aspectos del desarrollo del SNC: 1) Los mecanismos de especificación de tipos celulares en la neurogénesis embrionaria. Para ello nos hemos enfocado en dos conjuntos de neuronas que se identifican por la expresión de los neuropéptidos Leucokina y CCAP (Figura 2A). La pregunta subyacente es entender cómo se genera el enorme número de tipos celulares presentes en el SNC, a partir de un reducido número de células madre progenitoras (neuroblastos), y 2) Mecanismos que controlan la entrada en quiescencia de los neuroblastos embrionarios. Mediante técnicas genéticas y de biología celular y molecular queremos entender cómo esta controlada genéticamente la entrada en quiescencia de los neuroblastos embrionarios (Figura 2B). En otras palabras, cómo, por un lado, se evita que los neuroblastos sigan proliferando generando tumores y, por otro, se procura su presencia en estadios posteriores de desarrollo para reactivar su proliferación y así dar lugar, en una segunda neurogénesis, al SNC del adulto.

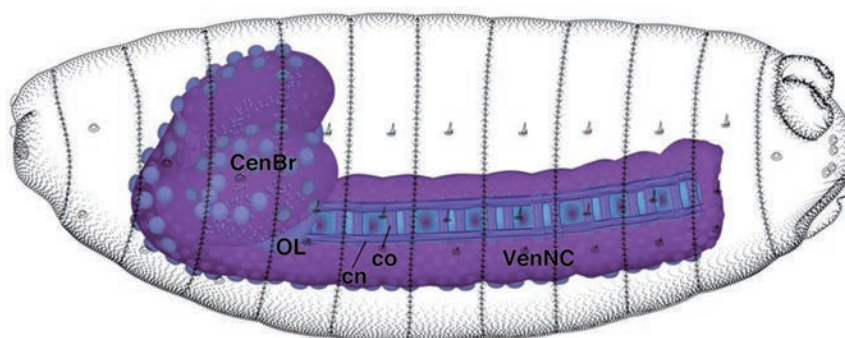


Figura 1. Sistema nervioso central de un embrión de *Drosophila* de estadio 17.

Figure 1. *Drosophila* CNS of an embryo of stage 17.

Research summary

We investigate the development of the central nervous system (CNS) using the fruit fly (*Drosophila melanogaster*) as a model system (Figure 1).

We are currently interested in two aspects of CNS development: 1) Mechanisms of cell fate specification in the embryonic neurogenesis. For that, we have focused in two sets of neurons identified by the expression of the neuropeptides Leucokinin and CCAP (Figure 2A). The underlying question is to understand how the fates of the huge number of different cell types present in the CNS are generated from a small number of progenitor stem cells (neuroblasts), and 2) Mechanisms controlling the entry into quiescence of the embryonic neuroblasts. We use genetics and cell and molecular biology approaches to understand how, after a proliferative phase that gives rise to the larval nervous system, the entry into quiescence of the embryonic neuroblasts is genetically controlled, (Figure 2B). In other words, how the proliferation of the neuroblasts is controlled to prevent, in the one hand, tumorigenesis and, in the other hand, to provide a reservoir of neural stem cells for the second neurogenesis, which occurs during larval development and gives rise to the adult CNS.

Publicaciones / Publications

Perea, D., Molohon, K., Edwards, K. and Diaz-Benjumea, F. J. (2013). Multiple roles of the gene zinc finger homeodomain-2 in the development of the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **130**, 467-481.

Estacio-Gomez, A., Moris-Sanz, M., Schafer, A. K., Perea, D., Herrero, P. and Diaz-Benjumea, F. J. (2013). Bithorax-complex genes sculpt the pattern of leucokineric neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **140**, 2139-48.

Estacio-Gomez, A. and Diaz-Benjumea, F. J. (2014). Roles of Hox genes in the patterning of the central nervous system of *Drosophila*. *Fly (Austin)* **8**, e27424.

Herrero, P., Estacio-Gomez, A., Moris-Sanz, M., Alvarez-Rivero, J. and Diaz-Benjumea, F. J. (2014). Origin and Specification of the Brain Leucokineric Neurons of *Drosophila*: Similarities to and Differences From Abdominal Leucokineric Neurons. *Dev Dyn* **243**, 402-414.

Moris-Sanz, M., Estacio-Gómez, A., Álvarez-Rivero, J. and Díaz-Benjumea, F. J. (2014). Specification of neuronal subtypes by different levels of Hunchback. *Development* **141**, 4366-4374.

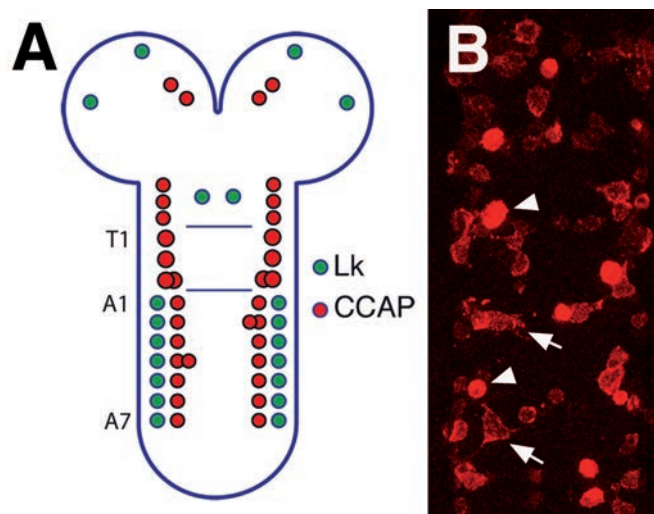
Tesis doctorales / Doctoral theses

Alicia Estacio Gómez (2014). Analysis of the specification of the abdominal leucokineric neurons in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Fernando Jiménez Díaz-Benjumea.

Marta Moris Sanz (2014). Análisis de los mecanismos de especificación de las neuronas CCAP/Bursicón en el sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Fernando Jiménez Díaz-Benjumea.

Figura 2. (A) Esquema mostrando el patrón de expresión de la Leucokina (verde) y la CCAP (rojo) en el SNC de una larva de primer estadio. (B) Neuroblastos quiescentes (flechas) y proliferando (puntas de flechas) en el SNC de un embrión de estadio 15 detectados por la expresión de Miranda.

Figure 2. (A) Diagram showing the pattern of expression of Leucokinin (green) and CCAP (red) in the CNS of a first instar larva. (B) Quiescent (arrows) and proliferative (arrowheads) neuroblasts in the CNS of an embryo of stage 15 detected by the expression of Miranda.



Laboratorio de polaridad epitelial

Epithelial polarity laboratory



Jefe de Línea / Group Leader:

Fernando Martín Belmonte

Postdoctorales/ Postdoctoral Fellows:

Ilenia Bernascone

Inmaculada Bañón

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Alejo Rodríguez-Fraticelli

Manuel Gálvez-Santisteban

Mariam Hachimi

Minerva Bosch

Técnicos de Investigación /

Technical Assistance:

Arantxa Borreguero Pascual

Tamara González

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Mar Aníbal

Laura Goea

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 e 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.

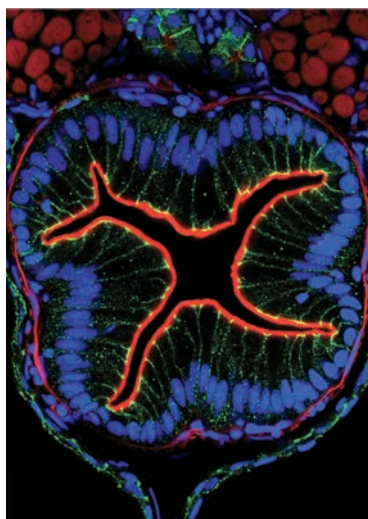


Figura 1. El reciclaje polarizado de proteínas SNARE controla la endocitosis apical y la morfogénesis en el intestino. Una sección transversal de un intestino larvario 18 días después de la fertilización se muestra después de teñir para visualizar F-actina (rojo), E-cadherina (verde) y los núcleos (azul).

Figure 1. Polarized SNARE recycling controls apical endocytosis and morphogenesis in the intestine. A transverse gut section of an 18 days post-fertilization larva is shown after co-staining to visualize F-actin (red), E-cadherin (green) and nuclei (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

Bañón-Rodríguez, I; Gálvez-Santisteban, M; Vergarajauregui, S; Bosch, M; Borreguero, A and Martín-Belmonte, F. (2014) The control of IQGAP membrane localization by EGFR regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *EMBO J* 1;33(2):129-45

Rodríguez-Fraticelli AE and Martín-Belmonte F. (2014) Picking up the threads: extracellular signals in epithelial morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, Oct;30:83-90.

Fernando Martín-Belmonte: epithelia embrace the space. (2014) Martín-Belmonte F, Sedwick C. *J Cell Biol*. Jun 23;205(6):756-7.

Suzanne Eaton and Fernando Martin-Belmonte (2014) Cargo Sorting in the Endocytic Pathway: A Key Regulator of Cell Polarity and Tissue Dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol*;6(10):a016899.

Bañón-Rodríguez, I; Bernascone, I and Martín-Belmonte, F. (2014). The role of epithelial cell polarity pathways on cancer stem cells. *Cancer Stem Cells –Book chapter–* ISBN: 978-1-118-35616-6. Wiley Press.

Methods for analysis of apical lumen trafficking using micropatterned 3D systems. (2013) Rodríguez-Fraticelli AE, Martín-Belmonte F. *Methods Cell Biol*;118:105-23.

Rodríguez-Fraticelli AE, Gálvez-Santisteban M and Martín-Belmonte F. (2013) KIF16B delivers for transcytosis. *EMBO J*;32(15):2093-5

Bernascone, I and Martín-Belmonte, F. (2013) Transcriptional control of polarity. *Trends Cell Biol*. S0962-8924(13)00051-2.

Rodríguez-Fraticelli AE and Martín-Belmonte F. (2013) Mechanical control of epithelial lumen formation. *Small GTPases*; 4(2).

Patentes / Patents

M Auzan, M Bornens, F Martin-Belmonte, AE Rodriguez-Fraticelli, J Young. (2013). Title: Methods and a device for the formation of 3D-multicellular assemblies. Country EU and USA. Applicant: CYTOO and CSIC. Filing Date: July 25, 2011. WO Patent 2,013,014,164.

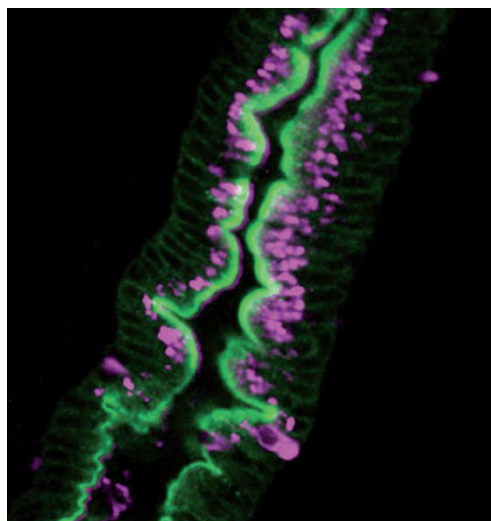
Tesis doctorales / Doctoral theses

Alejo Rodríguez-Fraticelli (2014). Identification and analysis of new molecular mechanism implicated in epithelial morphogenesis: mechanotransduction, spindle orientation and endocytosis. Universidad Autónoma de Madrid. Fernando Martín-Belmonte y Miguel A. Alonso.

Manuel Gálvez Santisteban (2014). Molecular and mechanical control of single lumen formation during epithelial morphogenesis by sinagtotagmin-like proteins. Universidad Autónoma de Madrid. Fernando Martín-Belmonte.

Figura 2. El reciclaje polarizado de proteínas SNARE controla la endocitosis apical y la morfogénesis en el intestino. Un plano sagital del intestino larvario 6 días después de la fertilización se muestra después de la alimentación forzada de un marcador de dextrano fluorescente (magenta). Las células endocíticas están marcadas con la proteína endosomal PLLP (verde).

Figure 2. Polarized SNARE recycling controls apical endocytosis and morphogenesis in the intestine. A sagittal plane of the gut in a 6 days post-fertilization larva is shown after force-feeding a fluorescently-labeled dextran (magenta). The endocytosing cells are labeled with endosomal protein PLLP (green).



Control genético de la morfogénesis en *Drosophila**Genetic control of morphogenesis in Drosophila*

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Ginés Morata Pérez

Personal Científico /
Scientific Staff:
Manuel Calleja Requena
Natalia Azpiazu

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Raquel Martín Palomeque
Carlos García Arqués
Noelia Pinal Seoane

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:

Luna Ballesteros Arias
María Martín Montero
Antonio José Montes Ruiz

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:

Angélica Cantarero Mateo
Rosa Mª González Herrera

Resumen de investigación

Durante el periodo 2013-2014, el laboratorio ha estado involucrado en dos líneas de trabajo: 1) el estudio del fenómeno de competición celular en relación con procesos apoptóticos y la formación de tumores, y 2) análisis experimental de la regeneración en los discos imaginales.

Con respecto a competición celular, hemos demostrado que funciona como un mecanismo de eliminación de células oncogénicas mediante apoptosis. Estamos estudiando los mecanismos que utilizan las células tumorales para evadir el control de la competición celular y desarrollar un tumor. Los resultados mas recientes (Ballesteros-Arias et al 2014), indican que esto lo pueden conseguir mediante la formación de un microambiente protector de 500-600 células. En estas condiciones la competición celular actúa sobre las células en la periferia del tumor, pero al ser un mecanismo que requiere interacciones de muy corto alcance las células en el centro del tumor están protegidas, permitiendo así su desarrollo. En estas circunstancias la competición celular revierte su papel y funciona como proceso pro-tumoral, debido a las señales proliferativas emitidas por las células tumorales en apoptosis del borde del tumor. Nuestro grupo pretende identificar los factores involucrados en la estimulación de la tumorigenesis por apoptosis. La conexión entre apoptosis y crecimiento tumoral puede tener implicaciones clínicas relevantes.

La segunda línea de trabajo ha sido el estudio de los procesos de regeneración en los discos imaginales. Estos estudios permiten examinar los mecanismos de reprogramación genética durante el proceso de reconstrucción de estructuras dañadas o eliminadas. Las publicaciones del grupo (Herrera et al 2013; Herrera and Morata, 2014) han demostrado que durante la regeneración el control epigenético de la identidad celular se colapsa, reconstruyéndose más tarde con células que han adquirido una nueva identidad por un mecanismo novedoso de señalización por células vecinas. Durante los próximos años planeamos realizar un estudio exhaustivo de la regeneración, especialmente de los procesos que conducen a la adquisición de nuevas identidades celulares.

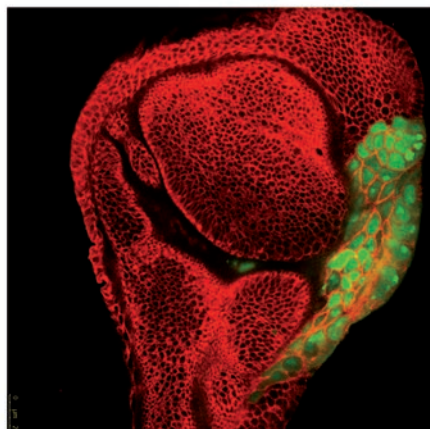


Figura 1. Disco imaginal de ala de *Drosophila* en cuyo compartimento posterior (verde) el gen *cdk1*, necesario para la división celular, está inactivo. La expresión de Fasciclin 3 (rojo) demarca los contornos celulares. Se observa un incremento del tamaño de las células posteriores, posiblemente una respuesta reguladora para mantener el tamaño del compartimento.

Figure 1. *Drosophila* wing imaginal disc in which the posterior compartment (green) is defective for *cdk1* function, necessary for cell division. Fasciclin 3 staining (red) at the membranes demarcates cell shape and size. There is a large increase in size of posterior cells, possibly a regulatory response to maintain overall size of the compartment.

Research summary

During the 2013-2014 period the group has focussed on two major research lines: 1) the study of cell competition, especially in relation with apoptosis and tumorigenesis, and 2) experimental analysis of regeneration in the imaginal discs.

Regarding cell competition, we have shown that it functions as a tumour suppressor mechanism, inducing apoptosis in oncogenic cells. We are presently analysing the mechanisms by which tumour cells may evade the control by cell competition and proceed to develop a tumour. Recent results (Ballesteros-Arias et al 2014) indicate that they can evade cell competition by forming a protective microenvironment of about 500-600 cells. In this situation, cell competition induces apoptosis in the cells at the periphery of the tumour, but it being a short-range phenomenon, tumour cells in the centre of the group are beyond its range and continue proliferating. Under these circumstances cell competition reverses its normal anti-tumour role and functions as a tumour stimulating factor, due to the proliferative signals that emanate from the tumour cells in apoptosis at the border of the tumour. We are presently trying to identify the factors involved in the tumorigenesis by apoptotic cells. The connection between apoptosis and tumour growth may have relevant clinical implications.

The second research line has been the analysis of regeneration in the imaginal discs; the overall aim is the study of the genetic reprogramming mechanisms during the reconstruction of structures that have been damaged or eliminated. Our recent publications (Herrera et al 2013; Herrera and Morata, 2014) have demonstrated that during regeneration the epigenetic control of cell identities breaks down transiently, allowing for changes in the identity of the affected cells, which reconstruct the missing organ. These cells become reprogrammed by a novel mechanism that requires interactions with their neighbours. In forthcoming years we plan to carry out a comprehensible study of regeneration of the different body parts of *Drosophila*, with special emphasis on the mechanism of acquisition of new cell identities.

Publicaciones / Publications

Herrera, S. Martin, R. and Morata, G. (2013) "Tissue homeostasis in the wing disc of *Drosophila*: immediate response to massive damage during development" *PLoS Genet* **9** (4), e10034446

Morata, G and Herrera, S. (2013). "Eiger triggers death from afar" *eLife* **2**:e01388.

Herrera, S and Morata, G. (2014) Transgressions of compartment boundaries and cell reprogramming during regeneration of the imaginal discs of *Drosophila* " *eLife*. **3**: e01831.

Ballesteros-Arias, L., Saavedra V, and Morata, G. (2014) Cell competition may function either as tumour-suppressing or as tumour-stimulating factor in *Drosophila*. *Oncogene* **33**, 4377-4384

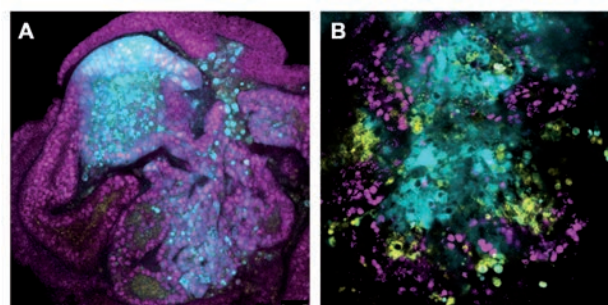
Morata, G. and Struhl, G. (2014) "Tethered wings" *Nature* **505**, 162-163

Morata, G. and Ballesteros-Arias L. (2014) Death to the losers. Cell competition is linked to innate immunity mechanisms to eliminate unwanted cells and maintain healthy tissue. *Science* **346**, 1181-1182

Costa M, Calleja M, Alonso CR, Simpson P. (2014) "The bristle patterning genes hairy and extramacrochaetae regulate the development of structures required for flight in Diptera" *Dev Biol.* **388**, 205-215.

Figura 2. La apoptosis asociada a los tumores puede inducir proliferación no autónoma en el primordio epitelial de ala de *Drosophila*. Las células tumorales de estas imágenes (marcadas en azul) son deficientes para *rab5*, un componente fundamental de la vía endocítica. Estas células, a pesar de ser viables por sí mismas, son eliminadas por competición celular por interacción con células normales, como indica la presencia de la caspasa Dcp1 (amarillo), que indica que entran en apoptosis. Además, las células normales que rodean el tumor responden a señales mitogénicas emitidas por las células apoptóticas. Esto se puede observar en el panel A por los altos niveles de la proteína dMyc (magenta) en las células que rodean al tumor, indicando un metabolismo activo. En el panel B se observa que las células que responden a los estímulos también incorporan BrdU (magenta), lo que indica que están proliferando debido a la interacción con células tumorales en apoptosis. Esto es especialmente interesante puesto que hemos demostrado que el crecimiento de estos tumores depende de las señales emitidas por las células apoptóticas.

Figure 2. Tumour-associated apoptosis can induce non-autonomous cell proliferation in the epithelial wing primordium of *Drosophila*. In these images tumour cells (labelled in blue) are defective for *rab5*, a key component of the endocytic pathway. These cells, although they are viable by themselves, are eliminated by cell competition, as shown by the activity of the caspase Dcp1 (yellow), indicator of apoptosis. Interestingly, normal cells surrounding the tumour respond to mitogenic signals secreted by the apoptotic cells. This can be observed in panel A by the acquisition of high levels of the protein dMyc (magenta) in the cells close to the growing tumour indicating an active metabolism. In panel B we can observe that the responding cells also incorporate BrdU (magenta), indicating that they are proliferating upon the interaction with apoptotic tumour cells. This has special relevance as we have proved that the growth of the tumour depends on the mitogenic signals secreted by dying cells.



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
(Hasta julio de 2014)

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Sonia Velázquez Beltrán
(Hasta diciembre 2013)

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Alexandra Atienza Manuel

Resumen de investigación

En nuestro laboratorio utilizamos la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para estudiar el desarrollo y la función, en condiciones normales y patológicas, de los sistemas muscular y excretor. Nuestra aproximación consiste en la identificación y caracterización funcional de genes implicados en la regulación de las distintas etapas de la miogénesis y en la formación y mantenimiento del diafragma de filtración renal.

Durante los dos últimos años nos hemos centrado en validar el uso de los nefrocitos de la mosca para modelar nefropatías. Estudios previos de nuestro laboratorio y de otros grupos habían puesto de manifiesto la similitud existente entre los diafragmas de filtración de los podocitos renales, componentes esenciales de la barrera de filtración glomerular, y los nefrocitos de *Drosophila*. Ambos diafragmas están formados por complejos multiproteicos integrados por proteínas ortólogas que forman una unión celular modificada. Ésta actúa a modo de filtro molecular, limitando el paso de moléculas de más de 15kDa, evitando así la pérdida de proteínas durante los procesos de ultrafiltración de la sangre y de la hemolinfa, respectivamente. Nuestros estudios han mostrado que los mecanismos que regulan la estabilidad de este sofisticado filtro molecular están conservados entre moscas y humanos. Además, nos han permitido adaptar con éxito a las moscas el modelo PAN de nefrosis inducida, de uso muy extendido en vertebrados. Estos resultados nos han permitido validar el uso del nefrocito de *Drosophila* como sistema modelo para estudiar la formación, mantenimiento y reparación del DF del podocito en condiciones normales y patológicas.

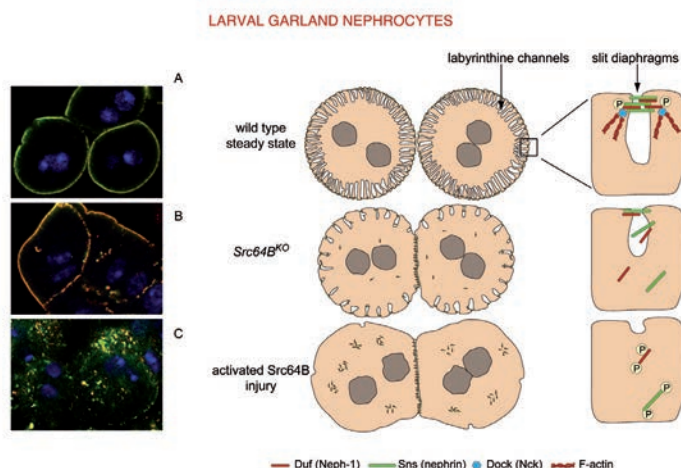


Figura 1. La estabilidad del diafragma de filtración de los nefrocitos se regula por fosforilación de su componente principal Dumbfounded (Duf)/ Neph1. La actividad de la kinasa Src64B es necesaria para el reclutamiento del adaptador Dock/Nck al componente del diafragma de filtración Duf, promoviendo la reorganización del citoesqueleto de actina. La hiperfosforilación de Duf conlleva a la disgregación del complejo del diafragma de filtración.

Figure 1. The stability of the nephrocyte filtration diaphragm is regulated by phosphorylation of its main constituent Dumbfounded (Duf)/ Neph1. Src64B kinase activity is required for the recruitment to the diaphragm of the adaptor Dock/Nck, promoting the rearrangement of the actin cytoskeleton. Hyperphosphorylation of Duf induces the disintegration of the filtration diaphragm protein complex.

Research summary

*The main aim of our research group is centred in understanding the development of the muscular and excretory systems during normal and pathological conditions using *Drosophila melanogaster* as model organism. Our approach consists in the identification and functional characterization of genes involved in the regulation of myogenesis and in the formation and maintenance of the kidney slit diaphragm.*

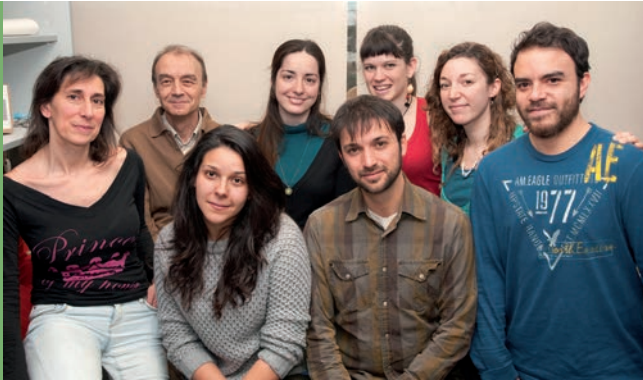
*During the last two years we have focussed in validating the use of *Drosophila* nephrocytes to model nephropathies. Previous data from our group and other laboratories demonstrated the high similarity existing between the podocyte slit diaphragms, main components of the glomerular filtration barrier, and the filtration diaphragms present in *Drosophila* nephrocytes. Both diaphragms are modified cell junctions formed by multi-protein complexes whose main constituents are orthologue proteins. The diaphragms act as molecular filters that limit the passage of molecules larger than 15kDa, preventing the leakage of proteins during the processes of blood and haemolymph ultrafiltration, respectively. Our studies have shown that the mechanisms that regulate the stability of this sophisticated filter are conserved between vertebrates and flies. Furthermore, we have been able to adapt to *Drosophila* the well-established vertebrate model of PAN-induced nephrosis. These results allowed us to validate the use of *Drosophila* nephrocytes as a model to study the formation, maintenance and repair of the podocyte slit diaphragm under normal and pathological conditions.*

Publicaciones / Publications

Tutor, A. S. and Ruiz-Gómez, M. (2013) Desarrollo embrionario del riñón. In: Arias Rodríguez, M (ed) Nefrología clínica. *Editorial Médica Panamericana*, Madrid, Spain, pp. 3-12.

Tutor, A. S., Prieto-Sánchez, S. and Ruiz-Gómez, M. (2014) Src64B phosphorylates Dumbfounded and regulates slit diaphragm dynamics: *Drosophila* as a model to study nephropathies. *Development* **141**, 367-376.

García-Guerra, L., Vila-Bedmar, R., Carrasco-Rando, M., Martín, M., Ruiz-Gómez, A., Ruiz-Gómez, M., Lorenzo, M., Fernández-Veledo, S., Mayor Jr., F., Murga, C. and Nieto-Vázquez, I. (2014) Skeletal muscle myogenesis is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Mol Cell Biol.* **6**, 299-311.

Especificación segmental y formación de patrón en *Drosophila**Segmental specification and pattern formation in Drosophila*

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Ernesto Sánchez-Herrero Arbide

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Karima Al-Akioui Sanz

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Delia del Saz Soler
Rafael Alejandro Juárez Uribe
Inés Olivera Crego
Nuria Prieto Hueso
Jesús Rodríguez Curt

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Paloma Martín Fernández

Resumen de investigación

En nuestra investigación estudiamos la función de los genes Hox en distintos aspectos del desarrollo de *Drosophila*. Por una parte, hemos analizado la función de estos genes en conferir a las células distintas afinidades y hemos visto que la diferente expresión de genes Hox es suficiente para mantener bordes de compartimento. Por otra parte, hemos estudiado, en colaboración con el grupo del Dr. E. Lai (Sloan Kettering, NY) la función de dos microRNAs en la regulación de la actividad de los genes Hox en el sistema nervioso. Demostramos que estos microRNAs reprimen la expresión de varios genes Hox y la de sus cofactores, y que esta represión es necesaria para el correcto desarrollo de la parte posterior del sistema nervioso y la fertilidad de las hembras. Otro aspecto de nuestra investigación aborda el estudio de la función de genes Hox y otros factores en la determinación de músculos del aparato genital masculino. Hemos visto que señales (vía JNK y otras) provenientes de células que rodean el testículo determinan el desarrollo de los músculos y el establecimiento de la forma en los testículos. Finalmente, investigamos la función del gen *Hox Abdominal-B* en suprimir el desarrollo del último segmento abdominal en el macho. Se está analizando la funcionalidad de distintos dominios conservados en esta proteína Hox y la interacción de la misma con cofactores como Extradenticle y Homothorax.

También hemos analizado el desarrollo de las uniones entre los segmentos distales de las patas de *Drosophila*. En la formación de las mismas se requiere muerte celular y la actividad de la vía de Notch. Hemos estudiado el gen *zinc finger homeodomain-2*, que se requiere para la formación de estas uniones, regulando la apoptosis y la actividad de la vía de Notch.

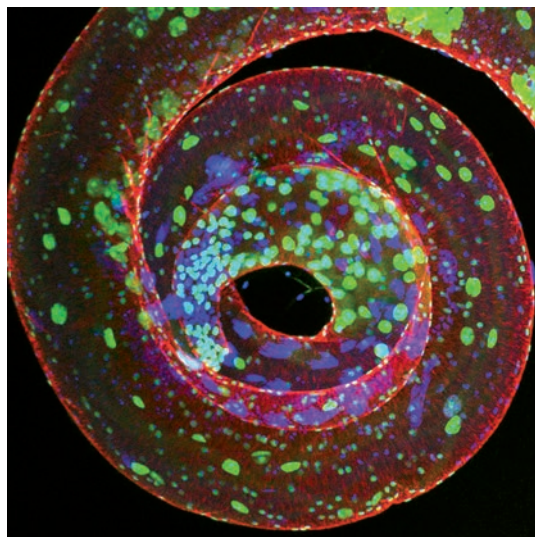


Figura 1. Testículo de *Drosophila melanogaster*, de forma espiralada. En verde se observan núcleos musculares, más pequeños, y de células somáticas gonadales (más grandes); tropomiosina (marcando el músculo liso) está en rojo y Topro en azul.

Figure 1. Coiled adult testis of *Drosophila melanogaster*. In green, muscle nuclei (small ones) and nuclei of somatic gonadal cells (bigger ones). Tropomyosin, labelling smooth muscle, is in red and Topro in blue.

Research summary

In our research we study the role of Hox genes in different aspects of *Drosophila* development. First, we analyzed the function of these genes in conferring different cell affinities, and we have seen that the different expression of Hox genes is sufficient to maintain compartment boundaries. We have also studied, in collaboration with the group of Dr. E. Lai (Sloan Kettering, NY), the function of two microRNAs in regulating Hox activity in the nervous system. Our results show that these microRNAs repress the expression of several Hox genes and their cofactors, and that this repression is necessary for the proper development of the posterior region of the nervous system and for the fertility of females. Another aspect of our research deals with the study of the function of Hox genes and other factors in determining male genital muscles. We have seen that signals (JNK pathway and others) from cells surrounding the testicle determine the development of muscles and the establishing of testes form. Finally, we investigate the role of the Hox gene *Abdominal-B* in suppressing the development of the male last abdominal segment. We are analyzing the functionality of various conserved domains thereof and the interaction of this Hox protein with the cofactors *Extradenticle* and *Homothorax*.

We have also analyzed the development of the joints between the distal segments of the legs of *Drosophila*. In forming the same, cell death and the activity of the Notch pathway are needed. We have studied the gene *zinc finger homeodomain-2*, required for the formation of these junctions, and which does so by regulating apoptosis and the activity of the Notch pathway.

Publicaciones / Publications

Curt, J. R., de Navas, L. and Sánchez-Herrero, E. (2013). Differential activity of *Drosophila* Hox genes induces myosin expression and can maintain compartment boundaries. *PLoS One* **8**, e1002874.

Sánchez-Herrero, E. (2013). Hox genes and cellular functions. *Scientifica* 2013, 738257.

Guarner, A., Manjón, C., Edwards, K., Steller, H., Suzanne, M. and Sánchez-Herrero, E. (2014). The *zinc finger homeodomain-2* gene of *Drosophila* controls Notch targets and regulates apoptosis in the tarsal segments. *Dev. Biol.* **385**, 350-65.

Garaulet, D. L., Castellanos, M., Bejarano, F., Sanfilippo, P., Tyler, D. M., Allan, D. A., Sánchez-Herrero, E* and Lai, E. C*. (2014). Homeotic function of *Drosophila Bithorax-Complex* miRNAs mediates fertility by restricting multiple Hox genes and TALE cofactors in the central nervous system. *Dev. Cell* **23**, 635-648.

De Navas, L., Foronda, D., del Saz, D. and Sánchez-Herrero, E. (2014). A Genetic Strategy to Obtain P-Gal4 Elements in the *Drosophila* Hox Genes. In: Graba, Y. and Rezsóhazy, R. (eds) Hox genes: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Springer-Verlag, vol. **1196**, pp. 49-57.

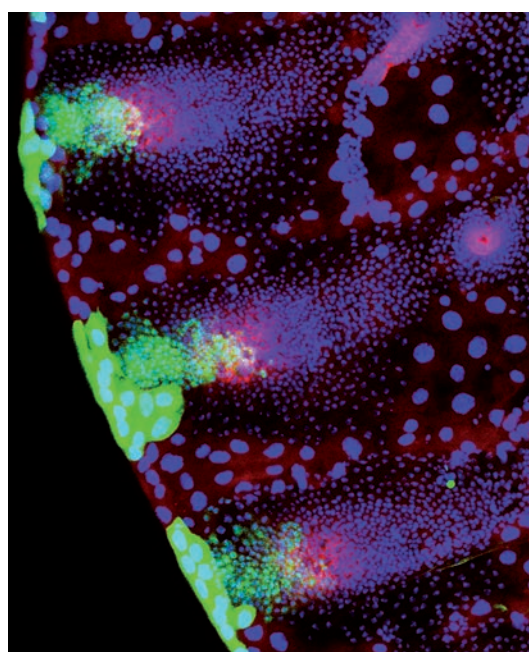
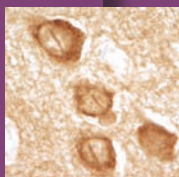


Figura 2. Segmentos abdominales de una pupa de *Drosophila melanogaster* mostrando la expresión de la línea pannier-Gal4 (verde), wingless (rojo) y Topro (azul).

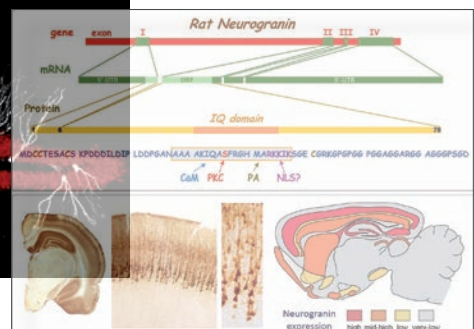
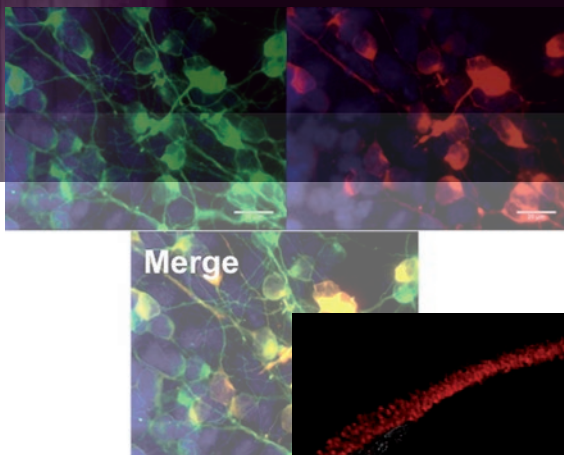
Figure 2. *Drosophila melanogaster* pupal abdominal segments showing GFP expression of the pannier-Gal4 line (green), wingless (red) and Topro (blue).

- 116 Fisiopatología de los transportadores de glicina en la neurotransmisión glicinérgica: hiperplexia y dolor
Physiopathology of glycine transporters in glycinergic neurotransmission: hyperekplexia and pain
CARMEN ARAGÓN RUEDA
- 118 Función de las proteínas microtubulares en neuronas
Function of microtubular proteins in neurons
JESÚS ÁVILA DE GRADO
- 120 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
MARÍA JESÚS BULLIDO
- 122 Fisiopatología y Terapia de las enfermedades neurodegenerativas: Ataxia de Friedreich
Physiopathology and therapy of Neurodegenerative diseases: Friedreich's Ataxia
JAVIER DÍAZ-NIDO
- 124 Bases Moleculares de la Plasticidad Neuronal
Molecular Bases of Neuronal Plasticity
FCO. JAVIER DIEZ GUERRA
- 126 Plasticidad y supervivencia cerebral durante el envejecimiento
Survival and plasticity in the aging brain
CARLOS DOTI
- 128 Mecanismos moleculares y celulares de la plasticidad sináptica
Molecular and cellular mechanisms for synaptic plasticity
JOSÉ ANTONIO ESTEBAN GARCÍA
- 130 Bases moleculares de las sinápsis glutamatérgicas
Molecular bases of glutamatergic synapses
CECILIO GIMÉNEZ MARTÍN / FRANCISCO ZAFRA
- 132 Lípidos en la fisiología y patología neuronal
Lipids in neuronal physiology and pathology
MARÍA DOLORES LEDESMA MUÑOZ
- 134 Enfermedad de Huntington y otras enfermedades del sistema nervioso central
Huntington's disease and other CNS disorders
JOSÉ JAVIER LUCAS LOZANO
- 136 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
- 138 Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias e investigación en nuevas terapias
Molecular basis of inherited metabolic diseases and research in novel therapies
LOURDES RUIZ DESVIAT
- 140 Señalización mitocondrial del calcio y señalización de insulina/leptina en envejecimiento
Calcium signalling in mitochondria and insulin/leptin signalling during ageing
JORGINA SATRÚSTEGUI GIL-DELGADO
- 142 Mecanismos moleculares de neurodegeneración
Molecular mechanism of neurodegeneration
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-Corcua

Predoctorales / *Predocctoral Fellows:*

Jaime de Juan Sanz (2013)

Esther Arribas González

Lucía Villarejo López

Cristina Benito Muñoz

Técnico de investigación /
Technical Assistance:

Enrique Núñez Balbuena

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Jorge Rodríguez Cabezas

Resumen de investigación

Nuestro grupo estudia la relación estructura-función, biogénesis, tráfico intracelular y regulación de los transportadores de glicina, GlyT1 y GlyT2, proteínas responsables de la finalización de la neurotransmisión glicinérgica. Nuestra investigación está orientada a patologías del SNC asociadas a disfunciones de las vías glicinérgicas, como la hiperplexia hereditaria humana y el dolor neuropático. GlyT2 recicla la glicina liberada y mutaciones en su gen (SLC6A5) son causantes de hiperplexia humana.

Hemos descrito el papel clave que la chaperona de retículo endoplásmico, calnexina (CNX), desempeña en la biogénesis de GlyT2 a través de la vía secretora temprana. La unión transitoria de CNX a un precursor parcialmente glicosilado de GlyT2 facilita el procesamiento del transportador. Hemos identificado los determinantes estructurales de la interacción GlyT2-CN X y las características cinéticas del proceso.

Hemos identificado un grupo de cuatro lisinas (K751, K773, K787, K791) del extremo C terminal de GlyT2 como los sitios de ubiquitinación que controlan su endocitosis constitutiva. La ubiquitinación de GlyT2 en neuronas es muy sensible a los niveles de ubiquitina libre, controlados por la UCHL1 deubiquitinasa, modulando ésta enzima, indirectamente, el *turnover* de GlyT2. Mediante técnicas de proteómica hemos identificado la interacción de GlyT2 con varias proteínas de la superficie neuronal. Hemos descrito un nuevo mecanismo modulador de la endocitosis y degradación lisosomal de GlyT2 a través de la interacción con la Na⁺-K⁺-ATPasa (NKA). La conservación evolutiva de este mecanismo regulador (pez cebra, rata) indica un papel relevante en el control de la neurotransmisión glicinérgica.

La Ca²⁺ATPasa (PMCA) y el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ son otras proteínas que interaccionan con GlyT2. La asociación funcional entre estas 3 proteínas permitiría corregir desequilibrios en la [Na⁺] producido durante periodos de elevada actividad de GlyT2 (co-transporta 3Na⁺/glicina) tras la liberación del neurotransmisor. La actuación conjunta del complejo GlyT2-PMCA-NCX y la Na⁺/K⁺-ATPase, funcionalmente más lenta, contribuiría así a la homeostasis local de Na⁺ y Ca²⁺ en la terminal nerviosa.

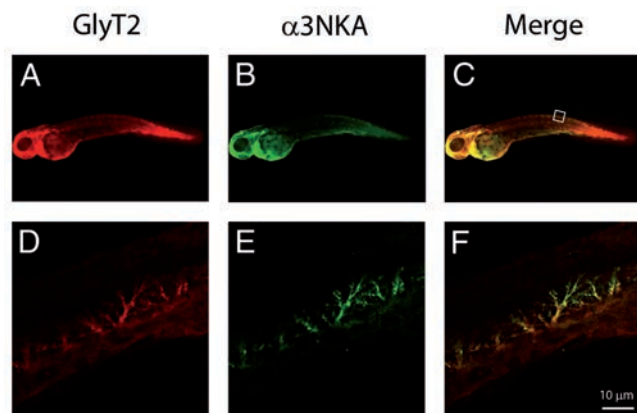


Figura 1. Colocalización de GlyT2-α3NKA en embriones de pez cebra. A-F, Embriones de pez cebra (48 hpf), se identifican con anticuerpos específicos y se analizan por microscopía confocal de fluorescencia (GlyT2 en verde, α3NKA en rojo). A-C, Imágenes de embriones de pez cebra. D-F, Colocalización de GlyT2 y α3NKA en interneuronas dorsales.

Figure 1. GlyT2-α3NKA colocalization in zebrafish embryos. A-F, Dechorionated zebrafish embryos (48 hpf) were immunostained for GlyT2 (green) and α3NKA (red), and visualized by confocal microscopy. A-C, Whole-mount images of zebrafish embryos. D-F, Colocalization of α3NKA and GlyT2 in dorsal interneurons.

Research summary

Current work involves the study of functional mechanism, biogenesis, intracellular trafficking, regulation of CNS glycine transporters, GlyT1 and GlyT2, plasma membrane proteins responsible for the completion of glycinergic transmission. Our research is oriented towards CNS pathologies associated with dysfunction of glycinergic pathways such as hyperekplexia and neuropathic pain. Indeed, mutations in the gene encoding GlyT2 can cause human hyperekplexia.

We have described the key role for calnexin (CNX), an endoplasmic reticulum chaperone, in the GlyT2 biogenesis through the early secretory pathway. We have studied the kinetic properties of the process and identified the structural determinants of the transient interaction between CNX and a precursor of GlyT2.

We have shown that ubiquitination of a C-terminus four lysine cluster of GlyT2 (K751, K773, K787, K791) is required for constitutive endocytosis, and also that the ubiquitination of GlyT2 in neurons is highly responsive to the free pool of ubiquitin. Thus, the deubiquitinating enzyme (DUB) ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCHL1), the major regulator of neuronal ubiquitin homeostasis, indirectly modulates the turnover of GlyT2. By using high-throughput mass spectrometry we have identified proteins interacting with GlyT2 in the CNS. The Na⁺-K⁺-ATPase (NKA) mainly interacts with the raft-associated active pool of GlyT2, and low and high levels of the specific NKA ligand ouabain modulate the endocytosis and total expression of GlyT2 in neurons. This downregulation of GlyT2 also occurs *in vivo* in two different systems: zebrafish embryos and adult rats, indicating that this NKA-mediated regulatory mechanism is evolutionarily conserved and may play a relevant role in the physiological control of inhibitory glycinergic neurotransmission.

Other GlyT2 partner interacting proteins identified by us are the Ca²⁺-ATPase (PMCA) and the Na⁺/Ca²⁺-exchanger. We have proposed a model in which a GlyT2/PMCA/NCX functional complex would help Na⁺/K⁺-ATPase in controlling local Na⁺ increases derived from GlyT2 (3Na⁺/glycine co-transport) activity after neurotransmitter release, thus contributing to the Na⁺ and Ca²⁺ local homeostasis in nerve terminal.

Publicaciones / Publications

de Juan-Sanz J, Núñez E, López-Corcuera B, Aragón C. (2013) Constitutive Endocytosis and Turnover of the Neuronal Glycine Transporter GlyT2 Is Dependent on Ubiquitination of a C-Terminal Lysine Cluster. *PLoS One* **8**(3): e58863.

Arribas-González E, Alonso-Torres P, Aragón C, López-Corcuera B. (2013) Calnexin-assisted biogenesis of the neuronal glycine transporter 2 (GlyT2). *PLoS One* **28**(5):e63230.

de Juan-Sanz J, Núñez E, Villarejo-López L, Pérez-Hernández D, Rodríguez-Fraticelli AE, López-Corcuera B, Vázquez J, Aragón C. (2013) Na⁺/K⁺-ATPase is a new interacting partner for the neuronal glycine transporter GlyT2 that down-regulates its expression *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci.* **33**, 14269-14281.

de Juan-Sanz J, Núñez E, López-Corcuera B, Aragón C. (2013) Regulación de la neurotransmisión glicinérgica en procesos de dolor inflamatorio: una nueva vía de acción de la prostaglandina E2 en médula espinal. *An. Real Acad. Farm.* **79**, 434-449.

Barthel F, Urban A, Schlösser L, Eulenburg V, Werdehausen R, Brandenburger T, Aragón C, Bauer I, Hermanns H. (2014) Long-term application of glycine transporter inhibitors acts antineuropathic and modulates spinal N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR-1 expression in rats. *Anesthesiology* **121**, 160-169.

de Juan-Sanz J, Núñez E, Berrocal M, Corbacho I, Ibáñez I, Arribas-González E, Marcos D, López-Corcuera B, Mata AM and Aragón C. (2014) Presynaptic control of glycine transporter 2 by physical and functional association with plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) and Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX). *J. Biol. Chem.* **289**, 34308–34324.

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.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Jaime de Juan-Sanz (12 abril 2013). Estudio del tráfico intracelular del transportador neuronal de glicina GlyT2: modulación por lipid rafts, ubiquitinación e interacción con Na⁺/K⁺-ATPase. Universidad Autónoma de Madrid. Directoras: Carmen Aragón y Beatriz López-Corcuera.

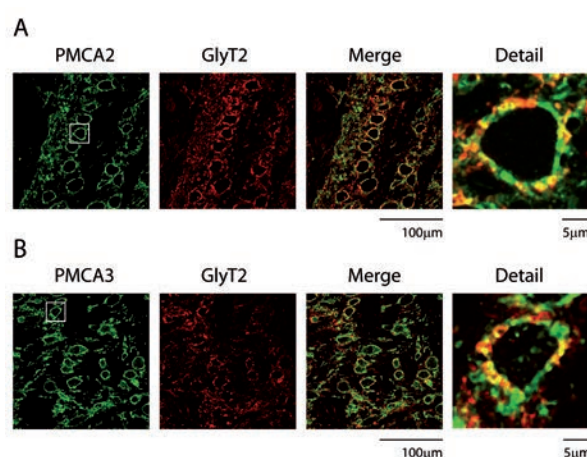


Figura 2. GlyT2 colocaliza con PMCA2 y PMCA3 en tallo cerebral. A y B, rodajas del núcleo coclear ventral de rata adulta se incuban con anticuerpos anti GlyT2 y PMCA2 (A) ó PMCA3 (B) y se analizan por microscopía confocal de fluorescencia (GlyT2 en rojo, PMCA en verde). Es de destacar la mayoritaria colocalización de ambas proteínas en estructuras presinápticas.

Figure 2. GlyT2 co-localizes with PMCA2 and PMCA3 in brainstem. A and B, ventral cochlear nucleus slices from adult rat were incubated with antibodies against GlyT2 and PMCA2 (A) or PMCA3 (B). The slices were visualized by confocal microscopy, showing GlyT2 in red and PMCA in green. Note the co-localization of both proteins, especially in presynaptic structures.

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 Matanzo
Alberto Gómez Ramos
Jerónimo Jurado Arjona

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Patricia Martín-Maestro
Noemí Pallas
Jesús Merchán

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Raquel Cuadros Catalán
Esther García García
Nuria de la Torre Alonso

Resumen de investigación

Nuestro grupo tiene como objetivo conocer la función de algunas proteínas del citoesqueleto, fundamentalmente de la proteína tau. Tau es una proteína neuronal, preferentemente localizada en el axón de una neurona, como otra proteína del citoesqueleto, MAP1B. Hemos estudiado la función de ambas proteínas en el proceso de maduración axonal. Por otra parte, la proteína tau, modificada por fosforilación o autoagregación, tiene un papel relevante en la enfermedad de Alzheimer. La fosforilación de tau se lleva a cabo, entre otras quinasas, por la proteína GSK3. En este periodo hemos estudiado el efecto de la sobreexpresión de GSK3 no solo en la fosforilación de tau sino en la neurogénesis adulta, en el giro dentado. Este proceso, relacionado con la adquisición de la memoria episódica, se encuentra afectado en la enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente, hemos analizado la toxicidad de la proteína tau fosforilada en diferentes tipos de sistemas: modelos animales, tejido humano o cultivos celulares. No solo hemos utilizado modelos para la enfermedad de Alzheimer, sino también de otras tauopatías.

Por último, hemos comenzado el análisis de posibles mutaciones somáticas en células cerebrales que pudieran ser la causa de un tipo, no analizado previamente, de enfermedad de Alzheimer esporádica. Para ello hemos comenzado la secuenciación de DNA de exomas de células de hipocampo de pacientes de Alzheimer y de controles no dementes.

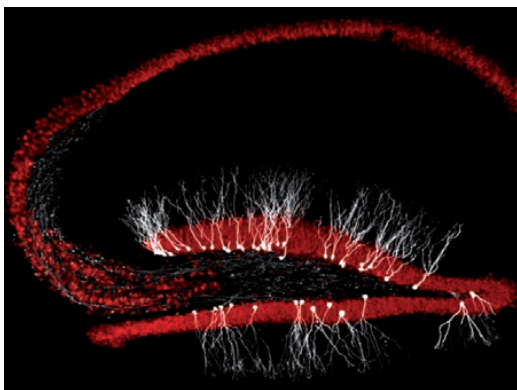


Figura 1. En ciertas regiones del cerebro se siguen formando neuronas durante toda la vida. El giro dentado es una de estas regiones donde tiene lugar la neurogénesis adulta, implicada en procesos como la memoria y el aprendizaje. En la imagen se observa la zona hipocámpal de ratón (núcleos neuronales de las distintas regiones marcados en rojo con anticuerpo NeuN) en el que se han marcado mediante retrovirus neuronas granulares formadas por neurogénesis adulta (marcaje blanco con anticuerpo GFP).

Figure 1. New neurons are generated in certain regions of the brain throughout life. Dentate gyrus is one of this regions where adult neurogenesis takes place. This process is involved in tasks such as memory and learning. In this picture, the hippocampal zone is shown (neuronal nuclei of the different regions are labeled in red using NeuN antibody) in which newborn granule neurons generated by adult neurogenesis have been marked using retrovirus (white labeling using GFP antibody).

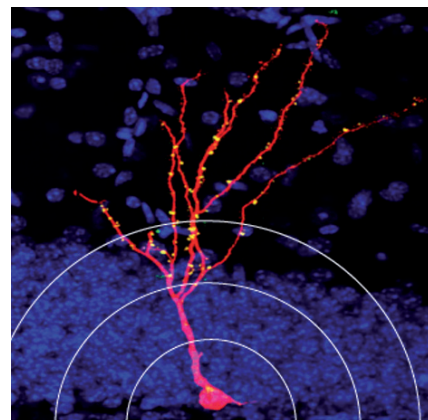


Figura 2. Neurona granular generada por neurogénesis adulta y marcada con retrovirus. Sobre ella se pueden realizar numerosos estudios morfológicos tanto del árbol dendrítico como de los contactos sinápticos.

Figure 2. Newborn granule neuron generated by adult neurogenesis and labeled with retrovirus. Several morphological parameters related with dendritic tree and synaptic contacts can be studied.

Research summary

The aim of our group is to understand the function (s) of a cytoskeletal protein, tau protein. Tau is a neuronal protein mainly located at the axon of a neuron, like other related axonal protein, MAP1B. In this period we have studied the role of both proteins on axonal maturation. On the other hand, modified tau (in phosphorylated or aggregated form), has a toxic effect in neurons, an effect that can take place in Alzheimer disease. The most prevalent tau kinase is GSK3 and we have studied the effect of a overexpression of GSK3 not only on tau phosphorylation but also on adult neurogenesis taking place at dentate gyrus, since that neurogenesis has been related to the acquisition of episodic memory, a process that is impaired in Alzheimer disease (AD). As indicated, we have also analyzed the toxicity of phosphorylated tau in different systems: animal models, human tissue or cell culture. In those studies we have not tested only AD models but also models for some other tauopathies.

Finally, we have started some studies related to the search of possible somatic mutations in brain cells that could promote a novel type of Sporadic Alzheimer Disease. To do that we have sequenced DNA, from exomes of hippocampal cells, obtained from AD patients or non demented controls.

Publicaciones / Publications

- Avila, J., de Barreda, E.G., Pallas-Bazarra, N., and Hernandez, F. (2013). *Aging Dis* **4**, 23-28.
- Avila, J., Gomez-Ramos, A., and Soriano, E. (2014a). *Front Aging Neurosci* **6**, 323.
- Avila, J., Simon, D., Diaz-Hernandez, M., Pintor, J., and Hernandez, F. (2014b). *J Alzheimers Dis* **40**, S7-S15.
- Barbosa, D.J., Serrat, R., Mirra, S., Quevedo, M., de Barreda, E.G., Avila, J., Ferreira, L.M., Branco, P.S., Fernandes, E., Lourdes Bastos, M., et al. (2014a). *Toxicol Sci* **139**, 407-420.
- Barbosa, D.J., Serrat, R., Mirra, S., Quevedo, M., Gomez de Barreda, E., Avila, J., Fernandes, E., Bastos, M.D., Capela, J.P., Carvalho, F., et al. (2014b). *Arch Toxicol*.
- Benoist, M., Palenzuela, R., Rozas, C., Rojas, P., Tortosa, E., Morales, B., Gonzalez-Billault, C., Avila, J., and Esteban, J.A. (2013). *EMBO J* **32**, 2287-2299.
- Camero, S., Benitez, M.J., Barrantes, A., Ayuso, J.M., Cuadros, R., Avila, J., and Jimenez, J.S. (2013). *J Alzheimers Dis* **39**, 649-660.
- Camero, S., Benitez, M.J., Barrantes, A., Ayuso, J.M., Cuadros, R., Avila, J., and Jimenez, J.S. (2014a). *J Alzheimers Dis* **39**, 649-660.
- Camero, S., Benitez, M.J., Cuadros, R., Hernandez, F., Avila, J., and Jimenez, J.S. (2014b). *PLoS One* **9**, e104690.
- Carranza, G., Castano, R., Fanarraga, M.L., Villegas, J.C., Goncalves, J., Soares, H., Avila, J., Marechchino, M., Campos-Olivas, R., Montoya, G., et al. (2013). *Cell Mol Life Sci* **70**, 357-371.
- Cuchillo-Ibanez, I., Balmaceda, V., Botella-Lopez, A., Rabano, A., Avila, J., and Saez-Valero, J. (2013). *PLoS One* **8**, e72297.
- El Kadmiri, N., Cuadros, R., El Moutawakil, B., Slassi, I., Avila, J., Nadifi, S., Hachem, A., and Soukri, A. (2014). *J Mol Neurosci* **54**, 774-779.
- Fernandez-Nogales, M., Cabrera, J.R., Santos-Galindo, M., Hoozemans, J.J., Ferrer, I., Rozemuller, A.J., Hernandez, F., Avila, J., and Lucas, J.J. (2014). *Nat Med*.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martin, M., Hernandez, F., and Avila, J. (2013a). *Mediators Inflamm* **2013**, 260925.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martin, M., Sierrol-Piquer, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., Avila, J., and Hernandez, F. (2013b). *Hum Mol Genet*, 1300-1315.
- Garcia-Cabrero, A.M., Guerrero-Lopez, R., Giraldez, B.G., Llorens-Martin, M., Avila, J., Serratos, J.M., and Sanchez, M.P. (2013). *Neurobiol Dis* **58**, 200-208.
- Garcia-Escudero, V., Martin-Maestro, P., Perry, G., and Avila, J. (2013). Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 162152.
- Gomez-Ramos, A., Sanchez-Sanchez, R., Muhaisen, A., Rabano, A., Soriano, E., and Avila, J. (2014). *PLoS One* **9**, e101412.
- Hernandez, F., Garcia-Garcia, E., and Avila, J. (2013a). *J Alzheimers Dis* **37**, 507-513.
- Hernandez, F., Lucas, J.J., and Avila, J. (2013b). GSK3 and Tau: *J Alzheimers Dis*, S141-144.
- Leon-Espinosa, G., Garcia, E., Garcia-Escudero, V., Hernandez, F., Defelipe, J., and Avila, J. (2013). *J Neurosci Res* **91**, 954-962.
- Llorens-Martin, M., Fuster-Matanzo, A., Teixeira, C.M., Jurado-Arjona, J., Ulloa, F., Defelipe, J., Rabano, A., Hernandez, F., Soriano, E., and Avila, J. (2013a). *Mol Psychiatry* **18**, 395.
- Llorens-Martin, M., Fuster-Matanzo, A., Teixeira, C.M., Jurado-Arjona, J., Ulloa, F., Defelipe, J., Rabano, A., Hernandez, F., Soriano, E., and Avila, J. (2013b). *Mol Psychiatry*, 451-460.
- Llorens-Martin, M., Blazquez-Llorca, L., Benavides-Piccione, R., Rabano, A., Hernandez, F., Avila, J., and DeFelipe, J. (2014a). *Front Neuroanat* **8**, 48.
- Llorens-Martin, M., Jurado, J., Hernandez, F., and Avila, J. (2014b). *Front Mol Neurosci* **7**, 46.
- Llorens-Martin, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., and Hernandez, F. (2014c). *Experimental neurology* **263**, 285-292.
- Llorens-Martin, M., Jurado-Arjona, J., Fuster-Matanzo, A., Hernandez, F., Rabano, A., and Avila, J. (2014d). *Transl Psychiatry* **4**, e463.
- Lopez-Menendez, C., Gamir-Morralla, A., Jurado-Arjona, J., Higuero, A.M., Campanero, M.R., Ferrer, I., Hernandez, F., Avila, J., Diaz-Guerra, M., and Iglesias, T. (2013). *Hum Mol Genet* **22**, 466-482.
- Martinez-Aguila, A., Fonseca, B., Hernandez, F., Diaz-Hernandez, M., Avila, J., and Pintor, J. (2014). *J Alzheimers Dis* **40**, S71-77.
- Medina, M., and Avila, J. (2013a). *Expert Opin Ther Targets* **18**, 69-77.
- Medina, M., and Avila, J. (2013b). *Expert review of neurotherapeutics* **13**, 495-503.
- Medina, M., and Avila, J. (2014a). *J Alzheimers Dis* **40**, S1-3.
- Medina, M., and Avila, J. (2014b). *Expert Opin Ther Targets* **18**, 69-77.
- Medina, M., and Avila, J. (2014c). *Biochem Pharmacol* **88**, 540-547.
- Medina, M., and Avila, J. (2014d). *Front Pharmacol* **5**, 227.
- Medina, M., and Avila, J. (2014e). *Front Cell Neurosci* **8**, 113.
- Medina, M., Avila, J., and Villanueva, N. (2013). *Mar Drugs* **11**, 1656-1668.
- Merino-Serrais, P., Benavides-Piccione, R., Blazquez-Llorca, L., Kastanouskaite, A., Rabano, A., Avila, J., and DeFelipe, J. (2013). *Brain* **136**, 1913-1928.
- Monroy-Ramirez, H.C., Basurto-Islas, G., Mena, R., Cisneros-Vega, B., Binder, L.I., Avila, J., and Garcia-Sierra, F. (2013). *J Alzheimers Dis* **36**, 503-520.
- Parcerisas, A., Rubio, S.E., Muhaisen, A., Gomez-Ramos, A., Pujadas, L., Puiggros, M., Rossi, D., Urena, J., Burgaya, F., Pascual, M., et al. (2014). *J Alzheimers Dis* **42**, 1357-1382.
- Perez, M., Cuadros, R., Pallas-Bazarra, N., Garcia, C., Langa, E., Jurado-Arjona, J., Hernandez, F., and Avila, J. (2014). *J Alzheimers Dis* **40**, 143-151.
- Perry, G., Zhu, X., Smith, M.A., Sorensen, A., and Avila, J. (2013). Preface. *J Alzheimers Dis* **33** Suppl 1, S1.
- Rabano, A., Rodal, I., Cuadros, R., Calero, M., Hernandez, F., and Avila, J. (2014). *J Alzheimers Dis* **40**, S123-133.
- Sahara, N., and Avila, J. (2014). *Front Neurol* **5**, 1.
- Sanchez-Mut, J.V., Aso, E., Panayotis, N., Lott, I., Dierssen, M., Rabano, A., Urdinguio, R.G., Fernandez, A.F., Astudillo, A., Martin-Subero, J.I., et al. (2013). *Brain* **136**, 3018-3027.
- Sayas, C.L., and Avila, J. (2014a). *J Alzheimers Dis* **40**, S17-22.
- Sayas, C.L., and Avila, J. (2014b). *Bioarchitecture* **4**, 1-5.
- Simon, D., Hernandez, F., and Avila, J. (2013). *Front Neurol* **4**, 74.
- Tortosa, E., Galjart, N., Avila, J., and Sayas, C.L. (2013). *EMBO J* **32**, 1293-1306.

Tesis doctorales / Doctoral theses

- Alberto Rábano** (2014). La patología de granos argirófilos y la tauopatía de tipo Alzheimer: características comunes y diferenciales. Universidad Autónoma de Madrid. Jesús Avila
- Jerónimo Jurado Arjona** (2014). Estudio de la neurogénesis adulta en un modelo murino de sobreexpresión de la glucógeno sintasa quinasa 3B en precursores neuronales. Universidad Autónoma de Madrid. Jesús Avila y Félix Hernández.

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:*
María Jesús Bullido

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Jesús Aldudo Soto
María Recuero Vicente

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Henrike Kristen

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Isabel Sastre Merlín

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Iván Fernández Frías
Manuel Manchón Romero
Patricia Llorente Ginés
Julia Terreros Roncal

Resumen de investigación

Para identificar genes y mecanismos involucrados en la neurodegeneración característica de la enfermedad de Alzheimer (EA), contamos con modelos celulares de estrés oxidativo (EO) y de infección por HSV 1 que muestran marcadores característicos de la EA, como alteraciones del proceso autofágico, de la fosforilación de la proteína tau o de la proteólisis de la proteína precursora del β -amiloide (APP).

En este período, hemos demostrado que la regulación del metabolismo de APP por EO implica a los dos principales sistemas proteolíticos celulares: ubiquitin/proteasoma y autofagia/lisosoma. Asimismo, hemos demostrado que el EO exacerba las alteraciones inducidas por HSV-1 mediante interacciones complejas que incluyen la inhibición de la replicación viral. Tanto HSV-1 como el EO bloquean la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, pudiendo provocar así las alteraciones observadas.

Mediante estudios de expresión génica hemos identificado un conjunto de genes activados por EO en células infectadas y en un modelo celular de EA familiar. Su estudio funcional sugiere que la interacción del EO tanto con HSV-1 como con mutaciones causantes de EA familiar altera la función lisosomal. Estos datos apoyan los resultados previos y los de otros autores, subrayando el papel de los lisosomas en diferentes formas de neurodegeneración.

Datos obtenidos en pacientes mediante estudios de asociación genética del grupo y de varios grupos colaborativos en los que participamos, como el consorcio IGAP, también apoyan esta implicación. Como ejemplo, un análisis reciente del IGAP sobre datos genómicos de unos 80.000 participantes señala a la endocitosis y la ubiquitinación de proteínas, procesos que convergen en el lisosoma, como dianas terapéuticas interesantes para la EA. Todos los resultados obtenidos durante el período 2013-14 apoyan la capacidad de HSV-1 para inducir procesos neurodegenerativos característicos de la EA, más aun en presencia de EO, y apoyan la implicación de la función lisosomal en estos procesos.

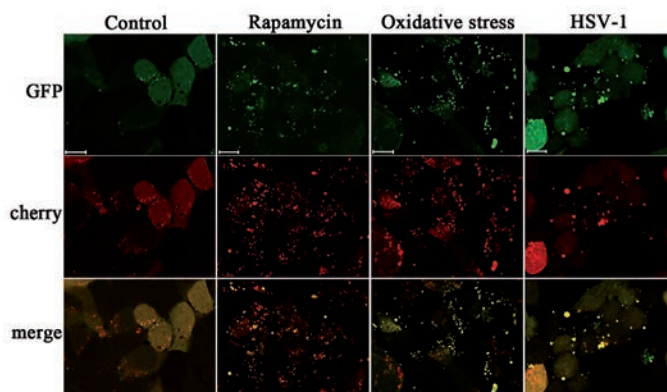


Figura 1. La infección con HSV-1 y el estrés oxidativo provocan un fallo en la fusión de autofagosomas con lisosomas.

Figure 1. HSV-1 infection and oxidative stress induce inefficient fusion between autophagosomes and lysosomes.

Research summary

To identify genes and mechanisms involved in the neurodegeneration associated with Alzheimer's disease (AD), we developed cellular models of oxidative stress (OS) and HSV-1 infection, that show changes characteristic of AD as those related with autophagy, tau protein phosphorylation and β -amyloid precursor protein (APP) proteolysis.

During this period, we have demonstrated that the regulation of APP metabolism by OS involves the two major cellular proteolytic machineries: the ubiquitin/proteasome and the autophagy-lysosome. We have also shown that OS exacerbates the effects of HSV 1 via complex interactions that include the inhibition of viral replication. Both HSV-1 and OS block the fusion of autophagosomes with lysosomes, and can in this way cause the observed alterations.

Using gene expression studies we have identified a set of genes activated by OS in infected cells and in a cell model of familial AD. Its pathway enrichment analysis suggests that the interaction of OS with HSV-1 or with mutations causing familial AD provokes alterations of the lysosomal function. These data support the findings mentioned above and those of other authors, highlighting the role of lysosomes in different forms of neurodegeneration.

Several data obtained in patients by genetic association studies of our group and of different collaborative projects in which we participate, as the IGAP consortium, also support this implication. Remarkably, a recent IGAP pathway enrichment analysis of genomic data from about 80,000 participants drew endocytosis and protein ubiquitination, processes that converge in the lysosome, as prime therapeutic targets for AD.

All the results obtained during the period 2013-14 support the ability of HSV-1 to induce neurodegeneration processes characteristic of AD, even more so in the presence of OS, and support the involvement of lysosomal function in these processes.

Publicaciones / Publications

Recuero, M., Munive, V. A., Sastre, I., Aldudo, J., Valdivieso, F., and Bullido, M. J. (2013). A free radical-generating system regulates A β PP metabolism/processing: involvement of the ubiquitin/proteasome and autophagy/lysosome pathways. *J Alzheimers Dis* **34**, 637-647.

Santana, S., Sastre, I., Recuero, M., Bullido, M. J., & Aldudo, J. (2013). Oxidative stress enhances neurodegeneration markers induced by herpes simplex virus type 1 infection in human neuroblastoma cells. *PLoS one* **8**, e75842.

Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Jun, G., Destefano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., et al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature genetics* **45**:1452-1458.

Lambert, J. C., Grenier-Boley, B., Harold, D., Zelenika, D., Chouraki, V., Kamatani, Y., Sleegers, K., Ikram, M. A., Hiltunen, M., Reitz, C., et al. (2013). Genome-wide haplotype association study identifies the FRMD4A gene as a risk locus for Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry* **18**, 461-470.

Rubio-Moscardo, F., Seto-Salvia, N., Pera, M., Bosch-Morato, M., Platta, C., Belbin, O., Gene, G., Dols-Icardo, O., Ingelsson, M., Helisalmi, S., et al. (2013). Rare variants in calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) found in early onset Alzheimer's disease patients alter calcium homeostasis. *PLoS one* **8**, e74203.

Bolos, M., Antequera, D., Aldudo, J., Kristen, H., Bullido, M. J., and Carro, E. (2014). Choroid plexus implants rescue Alzheimer's disease-like pathologies by modulating amyloid-beta degradation. *Cell Mol Life Sci* **71**, 2947-2955.

Escott-Price, V., Bellenguez, C., Wang, L. S., Choi, S. H., Harold, D., Jones, L., Holmans, P., Gerrish, A., Vedernikov, A., Richards, A., et al. (2014). Gene-wide analysis detects two new susceptibility genes for Alzheimer's disease. *PLoS one* **9**, e94661.

Ruiz, A., Dols-Icardo, O., Bullido, M. J., Pastor, P., Rodriguez-Rodriguez, E., Lopez de Munain, A., de Pancorbo, M. M., Perez-Tur, J., Alvarez, V., Antonell, A., et al. (2014). Assessing the role of the TREM2 p.R47H variant as a risk factor for Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Neurobiology of aging* **35**, 444 e1-4.

Otras actividades / Other activities

Pertenencia al Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) del Instituto de Salud Carlos III desde 2007.

Pertenencia al Grupo de Investigación "Neurobiología y Enfermedades Cerebrovasculares, Línea de Enfermedades neurodegenerativas" perteneciente al Instituto de Investigación Biosanitaria (IdiPAZ) desde 2010.

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:

Sara Pérez Luz

Frida Loria Salinas

Yurika María Katsu Jiménez

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Jara Moreno Lorite

Iván Fernández Frías

Mauro Agró

Resumen de investigación

Nuestro grupo de investigación está interesado en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, y, entre ellas, de las ataxias, que se caracterizan por la pérdida de neuronas en el cerebelo y la médula espinal. En particular, hemos centrado nuestra atención en la ataxia de Friedreich, que es una de las ataxias hereditarias más frecuentes. Intentamos esclarecer las bases moleculares de esta patología y desarrollar terapias (farmacológicas, génicas y celulares) que puedan ser eficaces para su tratamiento.

La ataxia de Friedreich está causada por un déficit de frataxina, una proteína localizada mayoritariamente en las mitocondrias. Además del proceso neurodegenerativo característico de esta enfermedad, muchos pacientes desarrollan también una cardiomiopatía hipertrófica y diabetes. Por este motivo, y aun siendo una enfermedad de inicio muy precoz, la ataxia de Friedreich puede servir también como un modelo muy útil para el estudio de enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento, en las que la disfunción mitocondrial 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. 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 está trabajando en el desarrollo de una terapia génica para la ataxia de Friedreich, tratando de optimizar las vías de aplicación y distribución de distintos vectores virales y no-virales en el sistema espinocerebelar. Además, nuestro grupo ha colaborado con otros en el estudio de las células de glía envolvente del sistema olfativo como promotoras de la reparación neuronal.

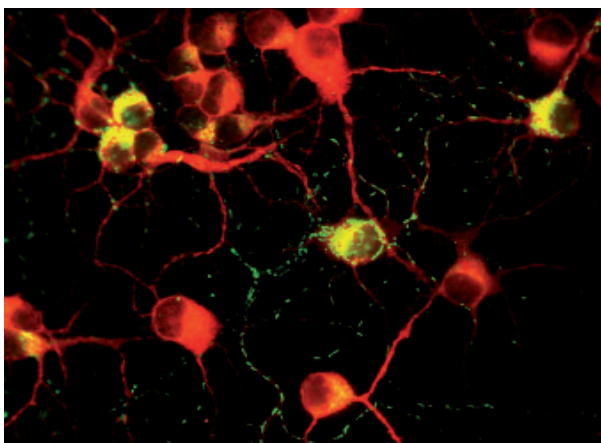


Figura 1. Localización mitocondrial de la frataxina expresada en neuronas granulares de cerebelo mediante un vector lentiviral.

Figure 1. Mitochondrial localization of overexpressed frataxin in cultured cerebellar granule neurons transduced with a lentiviral vector.

Research summary

Our research group is interested in the study of neurodegenerative diseases, particularly of ataxias, which are characterized by the loss of neurons in the cerebellum and spinal cord. We have focused our attention on Friedreich's ataxia, which is the most common hereditary ataxia in the Spanish population. We try to elucidate the molecular basis of this disease and develop novel therapies.

Friedreich's ataxia is caused by a deficiency of frataxin, a protein which mainly localizes to mitochondria. In addition to the neurodegenerative process, many patients also develop a hypertrophic cardiomyopathy and diabetes. For this reason, and despite of being a very early onset disease, Friedreich's ataxia may also serve as a useful model for the study of degenerative diseases associated with aging in which mitochondrial dysfunction plays an important role.

We have developed distinct neural cell models to study the molecular mechanisms underlying the degenerative process triggered by the frataxin deficiency. 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 is also working on the development of a gene therapy approach for Friedreich's ataxia trying to optimize the delivery of both viral and non-viral vectors in the spinocerebellar system. Furthermore, our group has collaborated with others in the optimization of the use of olfactory ensheathing glial cells to promote neuronal repair.

Publicaciones / Publications

Loría F, Díaz-Nido J. Frataxin knockdown in human astrocytes triggers cell death and the release of factors that cause neuronal toxicity. *Neurobiol Dis.* 2014 Dec 29;76C:1-12.

Tello Velasquez J, Watts ME, Todorovic M, Nazareth L, Pastrana E, Díaz-Nido J, Lim F, Ekberg JA, Quinn RJ, St John JA. Low-dose curcumin stimulates proliferation, migration and phagocytic activity of olfactory ensheathing cells. *PLoS One.* 2014 Oct 31;9(10):e111787.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Yurika Katsu Jiménez (2013). Nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la ataxia de Friedreich: HBSP y BDNF. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Javier Díaz-Nido.

Otras actividades / Other activities

Formar parte (como unidad 748) del Área de Medicina Mitocondrial y Neuromuscular del Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Raras (CIBERER), auspiciado por el Instituto de Salud Carlos III. <http://www.ciberer.es/>

Our Research Group belongs, as Unit 748, to the Mitochondrial and Neuromuscular 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". <http://www.ciberer.es/index.php?lang=english>.

Formar parte del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda (IDIPHIM). <http://www.investigacionpuertadehierro.com/index.php/presentacion/>.

We also belong to the "Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro Majadahonda IDIPHIM" (Health Research Institute "Puerta de Hierro Majadahonda"). <http://www.investigacionpuertadehierro.com/index.php/presentacion/>.

Delegado del Rector para Escuelas de Doctorado.

Javier Díaz-Nido is Rector's Delegate for Doctorate Schools.

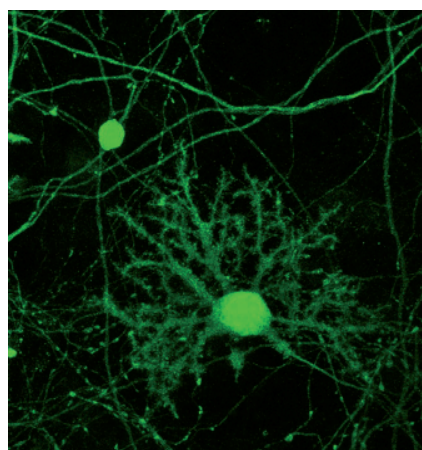


Figura 2. Neurona de Purkinje de cerebelo de ratón en cultivo primario.

Figure 2. Cultured Purkinje neuron from mouse cerebellum.

Bases Moleculares de la Plasticidad Neuronal

Molecular Bases of Neuronal Plasticity



Jefe de Línea / Group Leader:

Fco. Javier Díez Guerra

Paula Gutiérrez Pérez

Fernando Martín Fernandez

Alba Vera Zambrano

Álvaro Nuño Pérez

Técnicos de Investigación /

Technical Assistance:

Alberto Garrido García

Estudiantes / Undergraduate

Students:

Kate Pischke

Amanda Jiménez Pompa

M^a Teresa Villalba Villacorta

Celia Martínez Pérez

Lucía Morales Muñoz

Resumen de investigación

Nuestra investigación se orienta a comprender los mecanismos celulares y moleculares que modulan la plasticidad de las redes neuronales. Actualmente, estudiamos los mecanismos que utilizan las proteínas de unión a calcio para regular la plasticidad neuronal. La actividad sináptica desencadena oscilaciones en los niveles intracelulares de calcio que inician un número de vías de señalización. Calmodulina (CaM) es la proteína que transduce mayoritariamente estas señales. Su disponibilidad local y su actividad está regulada por proteínas como neurogranina (Ng), muy abundante en el entorno post-sináptico, capaz de secuestrar CaM, de forma dependiente de niveles de calcio y de su fosforilación por proteína quinasa C. Nuestra hipótesis de trabajo prevé que Ng ejerce una doble función: por un lado, impide la activación de efectores de CaM en respuesta a estímulos de baja intensidad y, por otro, selecciona y potencia la activación de vías de señalización dependientes de CaM. Estamos estudiando la regulación de la expresión de Ng, tanto su transcripción como su traducción local en dendritas. 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 de hipocampo y corteza cerebral, y técnicas de biología celular, bioquímica, biología molecular y microscopía avanzada. La reducción de Ng se asocia a trastornos cognitivos severos, presentes en varias enfermedades neurológicas, como hipotiroidismo o esquizofrenia. Como la expresión de Ng aparece de forma tardía durante el desarrollo y queda restringida a regiones cerebrales de gran plasticidad, pensamos que esta proteína constituye 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 nuevas terapias orientadas a mejorar la calidad de vida de personas mayores y pacientes afectados de enfermedades neurológicas.

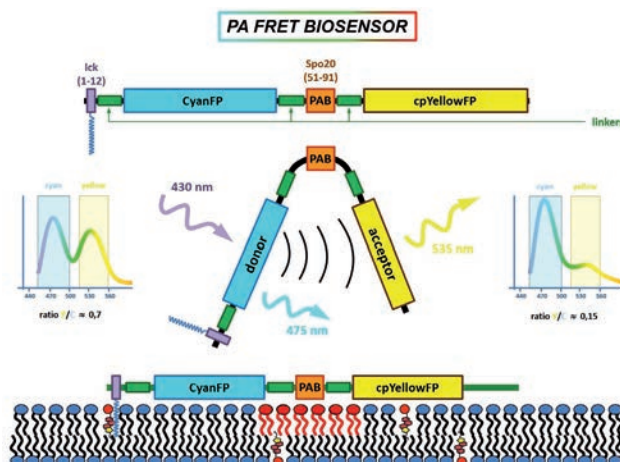


Figura 1. Diseño de un biosensor basado en FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) para la visualización y seguimiento de los niveles de ácido fosfatídico (PA) en la membrana plasmática celular (PAB: dominio de unión a PA).

Figure 1. Design of a FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)-based biosensor to dynamically visualize the fluctuations of Phosphatidic Acid (PA) in the cell plasma membrane (PAB: PA-binding domain).

Research summary

Our research is aimed at understanding the cellular and molecular mechanisms that modulate the plasticity of neural networks. Currently, we are studying the mechanisms utilized by calcium-binding protein to regulate neuronal plasticity. Synaptic activity triggers intracellular calcium oscillations that initiate a number of signaling pathways. Calmodulin (CaM), a calcium-binding protein, is the most common transducer of such calcium oscillations into intracellular signals. Its local availability and its activity are both regulated by proteins such as neurogranin (Ng), very abundant at the post-synaptic site, which sequesters CaM in a calcium and phosphorylation dependent manner. We propose that Ng act in two ways: one, by preventing the activation of CaM effectors in response to low-intensity stimuli and, the other, by favoring and enhancing downstream activation of some CaM-dependent signaling pathways. We are currently studying the regulation of Ng transcription and its local translation in dendrites. We have shown that Ng translocates to the nucleus in response to synaptic activity and that it specifically binds to phosphatidic acid (PA), a membrane phospholipid recognized as a signaling molecule. We use cultures of dissociated neurons from hippocampus and cerebral cortex, combined with cell biology, biochemistry, molecular biology and advanced microscopy techniques. Ng deficiency is tightly linked to cognitive impairment manifested in several neurological disorders, such as hypothyroidism or schizophrenia. As Ng expression appears belatedly during development and is restricted to brain regions of high plasticity, we think this protein is an excellent molecular target for the development of new drugs and therapies to improve cognitive skills. A wider and deeper knowledge on CaM-sequestering proteins and its mechanisms in the context of neuronal plasticity will foster the emergence of new therapies that will enhance the quality of life of aging individuals and patients suffering neurological diseases.

Publicaciones / Publications

M. Arias "Hernando Nefrología Clínica" 4ª Edición (2013) F. Javier Díez-Guerra y Carlos Sánchez "Técnicas Avanzadas de Microscopía Óptica para el Estudio de la Fisiopatología Celular". Capítulo 5, Sección 2ª. pags 49-63. Editorial Panamericana, Madrid.

Ferraz-Nogueira JP, Díez-Guerra FJ, Llopis J. (2014) "Visualization of Phosphatidic Acid Fluctuations in the Plasma Membrane of Living Cells". *PLoS ONE* 9(7): e102526.

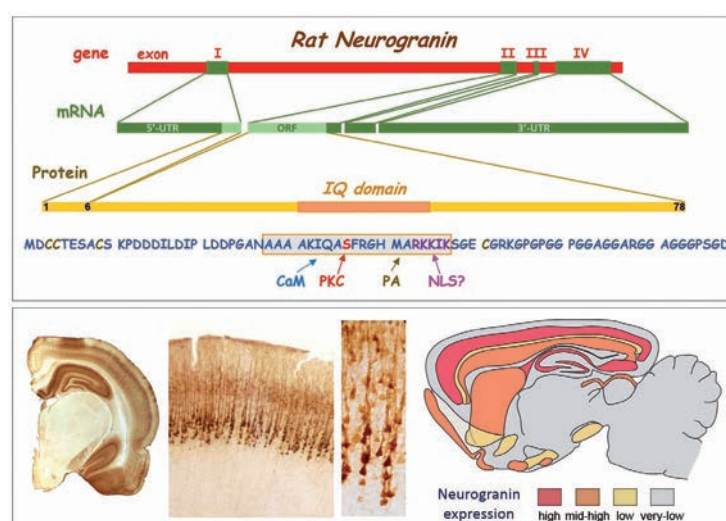


Figura 2. Esquema de la organización del gen, mRNA y la proteína Neurogranina (panel superior) y la distribución de su expresión en el cerebro de rata adulta (panel inferior).

Figure 2. Scheme showing the organization of the gene, mRNA and neurogranin protein (upper panel) and the distribution of its expression in the adult rat brain (lower panel).

Plasticidad y sobrevivencia cerebral durante el envejecimiento

Survival and plasticity in the aging brain

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Carlos Dotti

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Mauricio Martín
Isabela Alonso González

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Stefano Benvegnú

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ernest Palomer Vila
Adrián Martín Segura
Silvia de Vidania

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Irene Palomares Pérez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Inés Mateo Ruiz
Javier Carretero Abejón
Marta Castellana Cruz
Marina Simón Martín
Álvaro Casadomé Perales

Resumen de investigación

El objetivo final de nuestro laboratorio es la comprensión de los mecanismos involucrados en los déficits cognitivos del envejecimiento. El deterioro cognitivo del envejecimiento no es idéntico en todas las personas, existiendo una clara asociación entre el tipo y la gravedad del deterioro cognitivo y los rasgos hereditarios de cada individuo, así como con el estilo de vida. A nivel molecular y supra-molecular, los déficits cognitivos se deben a una combinación de déficits, a múltiples niveles: en las mitocondrias, en la síntesis de proteínas y su posterior control de calidad, en la degradación de desechos celulares, en el uso de hidratos de carbono y triglicéridos para la producción de energía celular, en la síntesis de hormonas, en la eficacia de renovación celular a través de células madre, en la organización de la membrana celular. Si bien en la mayoría de las personas las células del cerebro son capaces de soportar relativamente bien estos múltiples déficits, resultando en los síntomas leves y comunes del envejecimiento, como son empeoramiento de la memoria, disminución de la capacidad para mantener la atención y disminución de la capacidad para resolver problemas y en muchos otros los cambios moleculares no son bien tolerados, o son más intensos, lo que desencadena la aparición de afecciones graves, como la demencia, depresión o incluso la enfermedad de Alzheimer. De lo anterior se deduce que una disección cuidadosa de las causas, y los mecanismos que subyacen a la decadencia cognitiva en los ancianos puede facilitar la comprensión de las causas y los mecanismos implicados en la decadencia cognitiva patológica.

En nuestro laboratorio intentamos resolver esta pregunta mediante el estudio del efecto del envejecimiento sobre los mecanismos de regulación de supervivencia y plasticidad neuronal, a través de enfoques bioquímicos, moleculares, electrofisiológicos y de comportamiento.

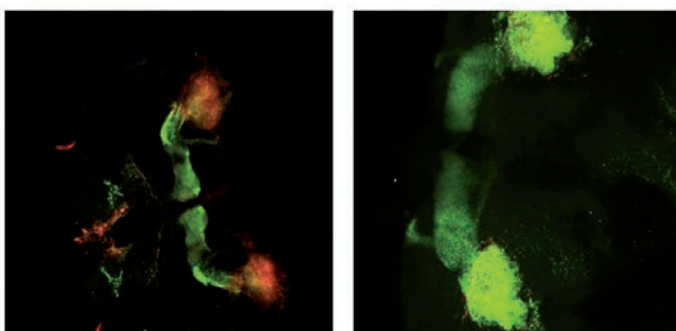


Figura 1. Transportadores de membrana que presentan defectos en el transporte axonal en el mushroom body de neuronas viejas de *Drosophila* (Panel derecho).

Figure 1. Membrane carriers appear to suffer axon-transport defects in mushroom body neurons of old *Drosophila* (Right panel).

Research summary

The general aim of the laboratory is to understand the mechanisms behind the decline in cognitive capacity that occurs during aging. Cognitive decline is not identical in all individuals and clear associations exist between the rate and severity of cognitive decline and the individual's heritable traits and lifestyle. At the molecular level, the aging phenotype is the consequence of a combination of deficits at multiple levels: mitochondria, protein synthesis and protein quality control machineries, degradation of cellular waste, carbohydrate and triglyceride metabolic pathways for ATP production, hormone synthesis, stem cell renewal, cell membrane organization. While in most individuals brain cells cope relatively well with these deficits, only resulting in the mild and common symptoms of aging, such as forgetfulness, decreased ability to maintain focus and decreased problem solving capability. In many others, these changes accumulate and progress resulting in more serious symptoms and conditions, such as dementia and depression or even Alzheimer's disease. It then appears that the fine dissection of the causes and mechanisms behind cognitive decay in the aged that we pursue, may facilitate the understanding of the causes and mechanisms involved in pathological cognitive decay.

We approach this question by investigating, through biochemical, molecular, electrophysiological and behavioral approaches, the effect of aging on neuronal plasma membrane-mediated survival and function signaling.

Publicaciones / Publications

Trovò, L., Ahmed, T., Buzzi, A., Callaerts-Vegh, Z., Bagni, C., Chua, M. VandenDriessche, T., D'Hooge, R., Balschum, D. and Dotti, C.G. (2013). Low hippocampal PI(4,5)P2 contributes to reduced cognition in old mice due to loss of MARCKs. *Nature Neurosci.* **16**(4):449 - 455.

Shariati SA, Lau P, Hassan BA, Müller U, Dotti CG*, De Strooper B, Gärtner A. (2013). APLP2 regulates neuronal stem cell differentiation during cortical development. *J. Cell Science.* **126**. 1268 – 1277.

Iannilli F, Zalfa F, Gartner A, Bagni C, Dotti CG. (2013). Cytoplasmic TERT Associates to RNA Granules in Fully Mature Neurons: Role in the Translational Control of the Cell Cycle Inhibitor p15INK4B. *PLoS ONE.* **8**(6). e66602.

Micholt L, Gärtner A, Prodanov D, Braeken D, Dotti CG* and Bartic C. (2013). Substrate Topography Determines Neuronal Polarization and Growth *In Vitro*. *PLoS ONE.* **8**(6). e66170

Martin MG, Ahmed T, Korovaichuk A, Venero C, Menchón SA, Salas I, Munck S, Herreras O, Balschun D, Dotti CG. (2014). Constitutive hippocampal cholesterol loss underlies poor cognition in old rodents. *EMBO Mol Med.* **6**. 902-917

Martin, MG., Pfrieger, F. And Dotti, CG. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. (2014) *EMBO Reports.* **15**. 1036-1052.

Gärtner A, Fornasiero EF, Valtorta F, Dotti CG. (2014). Distinct temporal hierarchies in membrane and cytoskeleton dynamics precede the morphological polarization of developing neurons. *J Cell Sci.* **127** (20), pp. 4409-4419.

Dotti CG, Esteban JA, Ledesma MD.(2014) Lipid dynamics at dendritic spines. *Front Neuroanat.* **8**:76.

La Fata G, Gärtner A, Domínguez-Iturza N, Dresselaers T, Dawitz J, Poorthuis RB, Averna M, Himmelreich U, Meredith RM, Achsel T, Dotti CG, Bagni C. (2014). FMRP regulates multipolar to bipolar transition affecting neuronal migration and cortical circuitry. *Nat Neurosci.* **Dec**;17(12):1693-700.

Patentes / Patents

Carlos G. Dotti, Mauricio Martín, César Venero Nuñez. "Uso de derivados azólicos para la reducción de pérdidas cognitivas asociadas al envejecimiento". Numero de prioridad: P201431798. País de prioridad: ES. Fecha de prioridad: -Diciembre 2014.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Enrique Gabandé (2014). Alteraciones de la autofagia mediadas por la acumulación de esfingomielina en la enfermedad de Niemann Pick tipo A. Universidad Autónoma de Madrid. Tesis codirigida por Carlos G. Dotti y M.D. Ledesma.

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
Marta Navarrete

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:

María Royo Cantabrana
Argentina Lario Lago
Rocío Palenzuela Muñoz

Cristina Sánchez-Puelles
Peñaranda
Jonathan Evan Draffin
Yolanda Gutiérrez Gonzalo

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:

María Muñoz Palencia
Raquel Jiménez Sánchez

Estudiantes /
Undergraduate Students:

Patricia Bermúdez Martín
Stephanie Norwood
Maite Azcorra Sedano
Carla Sánchez Castillo

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.

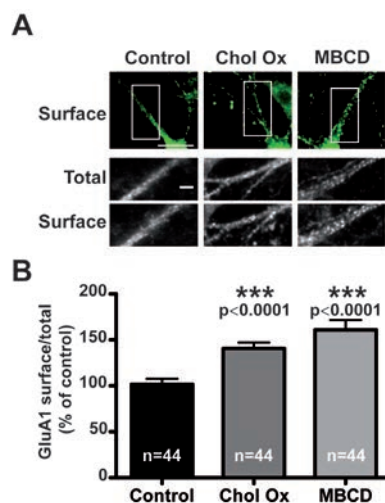


Figura 1. Aumento en la expresión de receptores AMPA en la superficie neuronal como consecuencia de la reducción de colesterol. A. Las neuronas fueron tratadas con "cholesterol oxidase" o con "methyl- β -cyclodextrin" para disminuir su contenido en colesterol. A continuación, la detección de los receptores AMPA se realizó por técnicas de inmunocitoquímica sobre cultivos neuronales, utilizando anticuerpos contra el dominio extracelular ("Surface") o intracelular ("Total") de la subunidad GluA1. La cuantificación de estos resultados se presenta en el panel B.

Figure 1. Increase in the expression of AMPA receptors on the neuronal surface on response to a reduction in cholesterol. A. Neurons were treated with cholesterol oxidase or with methyl- β -cyclodextrin in order to decrease cholesterol levels. Then, AMPA receptors were detected using cytochemical techniques on neuronal cultures, with antibodies against the extracellular ("Surface") or intracellular ("Total") epitopes of the GluA1 subunit. Quantifications of these results are shown on panel B.

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

Arendt, K. L., Benoist, M., Lario, A., Draffin, J. E., Muñoz, M. and Esteban, J. A. (2014) PTEN counteracts PIP3 upregulation in spines during NMDA-receptor-dependent long-term depression. *J. Cell. Sci.* **127**, 5253–5260.

Dotti, C. G., Esteban, J. A. and Ledesma, M. D. (2014) Lipid dynamics at dendritic spines. *Front. Neuroanat.* **8**:76.

Franco-Villanueva, A., Fernández-López, E., Gabandé-Rodríguez, E., Bañón-Rodríguez, I., Esteban, J. A., Antón, I. M. and Ledesma, M. D. (2014) WIP modulates dendritic spine actin cytoskeleton by transcriptional control of lipid metabolic enzymes. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4383–4395.

Ribeiro, L. F., Catarino, T., Santos, S. D., Benoist, M., van Leeuwen, J. F., Esteban, J. A. and Carvalho, A. L. (2014) Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E149–E158.

Benoist, M., Palenzuela, R., Rozas, C., Rojas, P., Tortosa, E., Morales, B., González-Billault, C., Ávila, J. and Esteban, J. A. (2013) MAP1B-dependent Rac activation is required for AMPA receptor endocytosis during long-term depression. *EMBO J.* **32**, 2287–2299.

Otras actividades / Other activities

Current Trends in Biomedicine Workshop on "Membrane Traffic at the Synapse. The Cell Biology of Synaptic Plasticity", Universidad Internacional de Andalucía, Baeza, España. 7-9 Octubre 2013.

Tesis doctorales / Doctoral theses

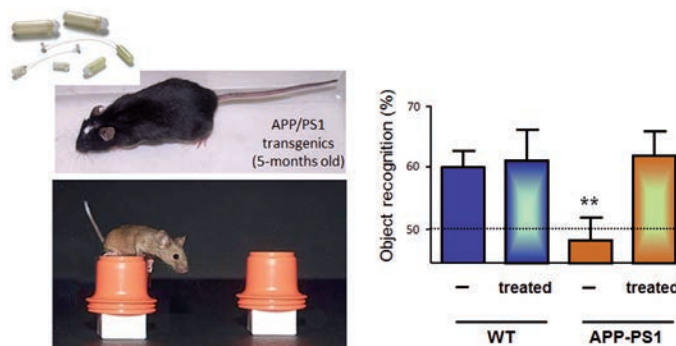
María Royo Cantabrana (2014). Papel de la proteína efectora Rab11-FIP2 en el transporte de receptores AMPA durante plasticidad sináptica. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José Antonio Esteban.

Rocío Palenzuela Muñoz (2014). The light chain of MAP1B: a novel modulator of AMPA receptor trafficking in hippocampal neurons. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José Antonio Esteban

Argentina Lario Lago (2014). Role of microtubule-dependent transport during synaptic plasticity in hippocampal neurons. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José Antonio Esteban.

Figura 2. Ejemplo de un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer (APP/PS1) tratado farmacológicamente con "mini-bombas osmóticas" y canulación intracerebroventricular (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 intracerebroventricular 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 sinápsis glutamatérgicas

Molecular bases of glutamatergic synapsesJefes 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:

Irene Sánchez Pascual
Sara Gutiérrez Peláz

Científicos Visitantes /

Visitor Scientists:

Angelina Rodríguez
(Univ. Autónoma de Querétaro,
Mexico)

Resumen de investigación

El trabajo de nuestro laboratorio está dedicado a la comprensión de los mecanismos moleculares de regulación de los procesos de flujo de neurotransmisores (principalmente glutamato y glicina) en el cerebro a través de transportadores, y cómo la desregulación de estas proteínas, o sus proteínas reguladoras asociadas, pueden contribuir a trastornos neurológicos (lesiones isquémicas en el cerebro) o psiquiátricos (esquizofrenia). El papel de los neurotransportadores para el glutamato y glicina es controlar los niveles de estos neurotransmisores en las sinapsis glutamatérgicas, regulando de esta manera la actividad de los receptores NMDA. Mientras que la sobreestimulación de estos receptores conduce a procesos neurodegenerativos, la hipofunción se ha asociado a la esquizofrenia. Nuestro trabajo se ha centrado en una mejor comprensión de los mecanismos de biogénesis: tráfico a través de la vía secretora y la distribución asimétrica de subdominios de la membrana, 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 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 / deubiquitination. Por otra parte, mantenemos interés en la función de la glicina como un neurotransmisor inhibitorio y su implicación en la enfermedad genética hiperekplexia. Estos estudios, se han realizado en los últimos años en colaboración con el grupo de la Dra. C. Aragón. Por último, recientemente nos hemos interesado en el estudio de los mecanismos moleculares que controlan el tráfico y la función de los canales de sodio Nav1.1, cuya disfunción está en la base de una epilepsia mioclónica severa llamada Síndrome de Dravet.

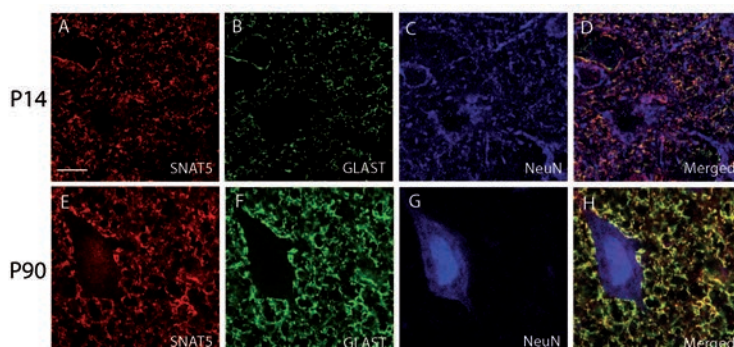


Figura 1. Desarrollo postnatal del transportador de glutamina SNAT5.

Figure 1. Postnatal development of the glutamine transporter SNAT5 in cerebral cortex.

Research summary

The work of our laboratory is dedicated to understanding the molecular mechanisms that regulate the flow of neurotransmitters (mainly glutamate and glycine) through neurotransmitter transporters in the brain, and how deregulation of these transporters or their associated regulatory proteins, can contribute to neurological or psychiatric disorders (ischemic lesions in the brain, schizophrenia). Glutamate and glycine neurotransmitters control the levels of these neurotransmitters in glutamatergic synapses thereby regulating the activity of NMDA receptors. While overstimulation of these receptors leads to neurotoxicity and neurodegenerative processes, their hypofunction has been associated with schizophrenia. Our work has focused on better understanding of the mechanisms of biogenesis: traffic through the secretory pathway and their asymmetric distribution in subdomains of the membrane, their anchoring to scaffold proteins and eventually their 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 and the location and 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. Moreover, we maintain interest in the role of glycine as an inhibitory neurotransmitter and its implication in the disease gene hyperekplexia. These studies have been made in recent years in collaboration with the group of Dr. C. Aragón. Finally, we have recently become interested in the study of the molecular mechanisms that control traffic and function of the sodium channel Nav1.1, whose dysfunction is the basis of a severe myoclonic epilepsy called Dravet Syndrome.

Publicaciones / Publications

de Juan-Sanz J, Núñez E, Zafra F, Berrocal M, Corbacho I, Ibáñez I, Arribas-González E, Marcos D, López-Corcuera B, Mata AM, Aragón C. (2014) Presynaptic control of glycine transporter 2 (GlyT2) by physical and functional association with plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) and Na^{+} - Ca^{2+} exchanger (NCX). *J Biol Chem.* **289**(49), 34308-34324.

Jiménez E, Núñez E, Ibáñez I, Zafra F, Aragón C, Giménez C. Glycine transporters GlyT1 and GlyT2 are differentially modulated by glycogen synthase kinase 3 β . *Neuropharmacology* **89**, 245-254.

Rodríguez A, Ortega A, Berumen LC, García-Alcocer MG, Giménez C, Zafra F. (2014) Expression of the System N transporter (SNAT5/SN2) during development indicates its plausible role in glutamatergic neurotransmission. *Neurochem Int.* **73**, 166-171.

Cubelos B, Leite C, Giménez C, Zafra F (2014). Localization of the glycine transporter GLYT1 in glutamatergic synaptic vesicles. *Neurochem Int.* **73**, 204-210.

Jiménez E, Núñez E, Ibáñez I, Draffin JE, Zafra F, Giménez C. (2014) Differential regulation of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST by GSK3 β . *Neurochem Int.* **79**:33-43.

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 » perteneciente al Instituto de Investigación Biosanitaria IdiPAZ desde noviembre 2010.

Cecilio Giménez es Director del Instituto de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

Elección de Cecilio Giménez como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Septiembre de 2013.

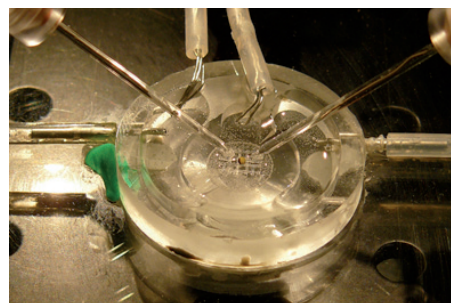


Figura 2. Registro electrofisiológico en un oocito de *Xenopus laevis*.

Figure 2. Electrophysiological recording in a *Xenopus laevis* oocyte.

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
Estefanía Fernández López
Enrique Gabandé Rodríguez
Azucena Pérez Cañamás

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Carolina Melero Jérez
Beatriz Soto Huelin
Daniel García Carrera
Rubén Capa Ortego

Resumen de investigación

La investigación en nuestro laboratorio pretende entender el papel de los lípidos en la fisiología y patología neuronal. Durante el período 2013-2014 nos hemos centrado en analizar un esfingolípido especialmente enriquecido en neuronas: la esfingomielina. Para ello hemos utilizado un ratón carente de esfingomielinasa ácida (ASMko) que es modelo para la enfermedad de Niemann Pick tipo A (NPA). NPA es una enfermedad de depósito lisosomal que presenta severas alteraciones neurológicas provocando la muerte temprana. La ausencia de su enzima catabólica provoca un aumento de los niveles de esfingomielina en los lisosomas y en la membrana plasmática y sináptica de las neuronas. Los estudios realizados en el ratón modelo han revelado un importante papel de la esfingomielina en procesos como la autofagia o la plasticidad sináptica.

La caracterización de los mecanismos moleculares subyacentes nos ha permitido ensayar, *in vitro* e *in vivo*, estrategias para prevenir las anomalías observadas. Estas estrategias abren perspectivas terapéuticas no sólo para NPA sino también para otras enfermedades de depósito lisosomal que conllevan la acumulación de esfingomielina en el cerebro. Además, los resultados obtenidos contribuyen a entender los efectos que el incremento de los niveles de esfingomielina en neuronas, que acontece durante el envejecimiento, tiene en las capacidades cognitivas.

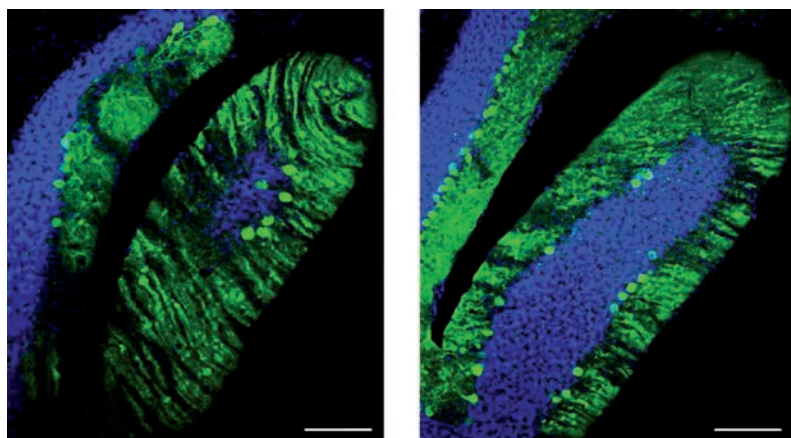


Figura 1. Prevención de la neurodegeneración en ratones ASMko mediante tratamiento oral con dexametasona. La figura muestra células de Purkinje identificadas por tinción de calbindina (en verde) en el cerebelo de ratones ASMko tratados (derecha) o no (izquierda) con dexametasona que reduce los niveles de esfingomielina por activación de la esfingomielinasa neutral. Tinción de Dapi (en azul) identifica núcleos neuronales. Barras=100µm.

Figure 1. Prevention of neurodegeneration in ASMko mice by oral treatment with dexamethasone. The image shows Purkinje cells identified by Calbindin staining (in green) in the cerebellum of ASMko mice treated (right) or not (left) with dexamethasone, which reduces sphingomyelin levels by activating the neutral sphingomyelinase. Dapi staining (in blue) identifies neuronal nuclei. Bars=100µm.

Research summary

Research in our laboratory aims to understand the role of lipids in neuronal physiology and pathology. During the time period 2013-2014 we have focused on the analysis of a sphingolipid especially enriched in neurons: sphingomyelin. To this aim we have used mice lacking the acid sphingomyelinase (ASMko), which are a model for Niemann Pick disease type A (NPA). NPA is an untreatable lysosomal storage disorder characterized by severe neurological involvement leading to early death. The absence of its catabolic enzyme promotes the accumulation of sphingomyelin in the lysosomes and in the plasma and synaptic membranes of neurons. The studies we have carried out in the mouse model have indicated a relevant role for sphingomyelin in processes such as autophagy and synaptic plasticity.

The characterization of the underlying molecular mechanisms allowed us to test strategies, *in vitro* and *in vivo*, to prevent the observed anomalies. These strategies open new therapeutical perspectives not only for NPA but also for other lysosomal storage disorders, which also show sphingomyelin accumulation in the brain. Moreover, the results obtained contribute to understand the effects that the high sphingomyelin levels, observed in neurons during aging, have in cognitive capacities.

Publicaciones / Publications

Agostini F, Dotti CG, Pérez-Cañamás A, Ledesma MD, Benetti F, Legname G. (2013) Prion protein accumulation in lipid rafts of mouse aging brain. *PLoS One*. **8**, e74244.

Arroyo AI, Camoletto PG, Morando L, Sassoe-Pognetto M, Giustetto M, Van Veldhoven PP, Schuchman EH, Ledesma MD. (2014) Pharmacological reversion of sphingomyelin-induced dendritic spine anomalies in a Niemann Pick disease type A mouse model. *EMBO Mol Med*. **6**, 398-413.

Gabandé-Rodríguez E, Boya P, Labrador V, Dotti CG, Ledesma MD. (2014) High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann Pick disease type A. *Cell Death Differ*. **21**, 864-875.

Franco-Villanueva A, Fernández-López E, Gabandé-Rodríguez E, Bañón-Rodríguez I, Esteban JA, Antón IM, Ledesma MD. (2014) WIP modulates dendritic spine actin cytoskeleton by transcriptional control of lipid metabolic enzymes. *Hum Mol Genet*. **23**, 4383-4395.

Dotti CG, Esteban JA, Ledesma MD. (2014) Lipid dynamics at dendritic spines. *Front Neuroanat*. **8**:76.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Estefanía Fernández López (2013). Influencia de WIP en el citoesqueleto de actina y la composición lipídica de las espinas dendríticas. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: María Dolores Ledesma, Inés Antón.

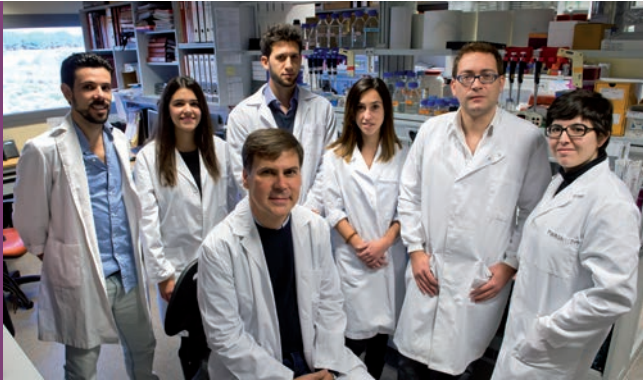
Enrique Gabandé Rodríguez (2014). Alteraciones de la autofagia mediadas por la acumulación de esfingomielina en la enfermedad de Niemann Pick tipo A. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: María Dolores Ledesma, Carlos Dotti.

Cristian Galván (2014). Relevancia de los rafts en la polaridad neuronal e implicación de sus alteraciones en la enfermedad de Niemann Pick tipo A. Universidad Católica de Córdoba (Argentina). Directores: María Dolores Ledesma, Dante Beltramo.

Ana Isabel Arroyo Tejedor (2014). Caracterización y rescate de las anomalías en espinas dendríticas en un modelo murino para la enfermedad de Niemann Pick tipo A. Universidad Autónoma de Madrid. Directora: María Dolores Ledesma.

Enfermedad de Huntington y otras enfermedades del sistema nervioso central

Huntington's disease and other CNS disorders



Jefe de Línea / *Group Leader:*
José Javier Lucas Lozano

Personal Científico /
Scientific Staff:
María Santos Galindo

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Raquel Gómez Sintés
Jesús Torres Peraza
Jorge Rubén Cabrera Heredia

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Marta Fernández Nogales
Alberto Parras Rodríguez
Ivó Hernández Hernández

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Miriam Lucas Santamaría

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Elena Llorente Martín

Resumen de investigación

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante caracterizada por movimientos involuntarios, síntomas psiquiátricos y demencia, causada por una expansión del trinucleótido CAG en el exón 1 del gen de la huntingtina. En nuestro laboratorio estudiamos las bases moleculares de la EH a través de abordajes *in vitro* e *in vivo* (generando y caracterizando modelos transgénicos que pudieran tanto imitar la enfermedad como revertirla) y de estudios sobre material humano obtenido de pacientes. Gracias al tejido cerebral post-mortem de enfermos de EH hemos podido demostrar el desbalance en las isoformas de tau 3R y 4R que sufren los pacientes y descubrir una nueva marca histopatológica (los "Tau Nuclear Rods" o TNRs) en esta enfermedad, consistente en la presencia de tau en invaginaciones nucleares (Nat Med. 2014, 20(8):881-5). El uso de animales transgénicos con distintos niveles de tau nos permitió observar cómo una disminución moderada de esta proteína en animales modelo de EH era capaz de revertir el fenotipo enfermo. Este hallazgo relaciona la EH con las tauopatías, ampliando las posibles terapias aplicables en EH a muchas de las generadas para el tratamiento de las tauopatías, entre las que se encuentra la enfermedad de Alzheimer.

También hemos descrito por primera vez la expresión de ATF5, una proteína de estrés de retículo, en neuronas de cerebro adulto (Brain, 2013, 136(Pt 4):1161-76) y su inducción con efectos neuroprotectores en un modelo de epilepsia. La caracterización de un modelo de inhibición genética de GSK-3 nos ha permitido observar un fenotipo tipo EH en el que aparecen déficits motores y apoptosis neuronal mediada por Fas/NFAT (PLoS One, 2013, 8(8):e70952). Asimismo, hemos estudiado el fenotipo de un ratón con una delección natural en DISC1, que muestra una amplia variedad de comportamientos relacionados con enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (Front Behav Neurosci, 2014, 8:253).

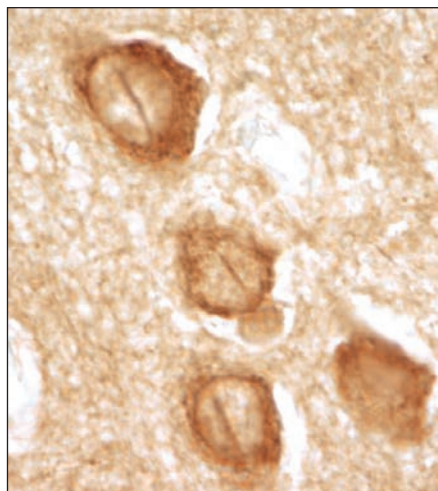


Figura 1. La nueva marca histopatológica TNR (tau nuclear rod) en Enfermedad de Huntington. Inmunohistoquímica frente a tau en la que se observa la marca con forma de varilla atravesando el núcleo neuronal.

Figure 1. The new histopathological hallmark TNR (tau nuclear rod) in Huntington's disease: immunohistochemical staining against tau. The rod shaped tau staining through the neuronal nuclei can be observed.

Research summary

Huntington's disease is an autosomal dominant neurodegenerative disease characterized by involuntary movements, psychiatric symptoms and dementia. It is caused by an expansion of the trinucleotide CAG located in exon 1 of the huntingtin gene. In our lab we study the molecular basis of HD through in vitro and in vivo (generating and characterizing transgenic models that could mimic as well as revert the disease) approaches and through studies on human material from patients. Thanks to the human brain post-mortem tissue from HD individuals we could demonstrate the imbalance in the tau isoforms with 3 or 4 Microtubule Binding Domains and discover a new histopathological hallmark (the Tau Nuclear Rods or TNRs), consisting on the presence of tau in nuclear indentations (Nat Med. 2014, 20(8):881-5). The utilization of transgenic animals with varying levels of tau allowed us to observe how a moderate decrease in this protein in HD model mice was able to attenuate the disease phenotype. This discovery relates HD with tauopathies, broadening the possible therapies applicable to HD to those generated for the treatment of tauopathies, such as Alzheimer's disease.

We have also described for the first time the expression of ATF5, an ER stress protein, in adult brain neurons (Brain, 2013, 136(Pt 4):1161-76) and its induction with neuroprotective effects in an epilepsy model. The characterization of a model of genetic inhibition of GSK-3 has allowed us to observe an HD-like phenotype with motor deficits and neuronal apoptosis mediated by Fas/NFAT (PLoS One, 2013, 8(8):e70952). Additionally, we have studied the phenotype of a mouse strain with a natural deletion in DISC1, which shows a broad variety of psychiatric disease related behaviors (Front Behav Neurosci, 2014, 8:253).

Publicaciones / Publications

Hernandez F, Lucas JJ, Avila J. (2013) GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 33 Suppl 1:S141-4. Review.

Borgonovo JE, Troncoso M, Lucas JJ, Sosa MA. (2013) Mutant huntingtin affects endocytosis in striatal cells by altering the binding of AP-2 to membranes. *Exp Neurol.* 241:75-83.

Engel T, Sanz-Rodriguez A, Jimenez-Mateos EM, Concannon CG, Jimenez-Pacheco A, Moran C, Mesuret G, Petit E, Delanty N, Farrell MA, O'Brien DF, Prehn JH, Lucas JJ, Henshall DC. (2013) CHOP regulates the p53-MDM2 axis and is required for neuronal survival after seizures. *Brain.* 136(Pt 2):577-92.

Torres-Peraza JF, Engel T, Martín-Ibáñez R, Sanz-Rodríguez A, Fernández-Fernández MR, Esgeas M, Canals JM, Henshall DC, Lucas JJ. (2013) Protective neuronal induction of ATF5 in endoplasmic reticulum stress induced by status epilepticus. *Brain.* 136(Pt 4):1161-76.

Gómez-Sintes R, Lucas JJ. (2013) Neuronal apoptosis and motor deficits in mice with genetic inhibition of GSK-3 are Fas-dependent. *PLoS One.* 8(8):e70952.

Casadei N, Pöhler AM, Tomás-Zapico C, Torres-Peraza J, Schwedhelm I, Witz A, Zamolo I, De Heer R, Spruijt B, Noldus LP, Klucken J, Lucas JJ, Kahle PJ, Krüger R, Riess O, Nuber S. (2014) Overexpression of synphilin-1 promotes clearance of soluble and misfolded alpha-synuclein without restoring the motor phenotype in aged A30P transgenic mice. *Hum Mol Genet.* 23(3):767-81.

Formentini L, Pereira MP, Sánchez-Cenizo L, Santacatterina F, Lucas JJ, Navarro C, Martínez-Serrano A, Cuezva JM. (2014) In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *EMBO J.* 33(7):762-78.

Fernández-Nogales M, Cabrera JR, Santos-Galindo M, Hoozemans JJ, Ferrer I, Rozemuller AJ, Hernández F, Avila J, Lucas JJ. (2014) Huntington's disease is a four-repeat tauopathy with tau nuclear rods. *Nat Med.* 20(8):881-5.

Gómez-Sintes R, Kvaio M, Gogos JA, Lucas JJ. (2014) Mice with a naturally occurring DISC1 mutation display a broad spectrum of behaviors associated to psychiatric disorders. *Front Behav Neurosci.* 8:253.

Ortega Z, Lucas JJ. (2014) Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Front Mol Neurosci.* 7:77. Review.

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>

Premio al mejor trabajo original de Personal Investigador No en Plantilla (PINP) del CBMSO (2014): Marta Fernández Nogales por el artículo Nat Med. 20(8):881-5).

Premio al mejor póster presentado al EHDN (European Huntington's Disease Network) Meeting 2014.

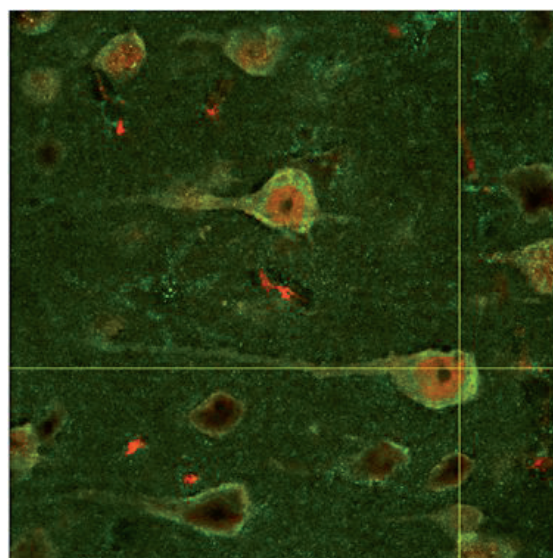


Figura 2. La proteína ATF5 es expresada por neuronas en el cerebro adulto de ratón: imagen de microscopía confocal. Podemos observar neuronas teñidas con NeuN (rojo) en las que colocaliza la proteína ATF5 (verde).

Figure 2. The protein ATF5 is neuronally expressed in the adult mouse brain: confocal microscopy image. We can observe neurons stained with NeuN (red) in which the protein ATF5 (green) colocalize.

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:*
Marta Pérez Pereira

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Silvia García López
Virginia Sandoñs Martín.
Tania Ramos Moreno
Indumathi Vedarethinam

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Anna Nelke

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Beatriz Moreno Moreno

Beatriz García Martínez
Marta Gonzalez Mella

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Luis José Marte
Virginia Nieto Romero
Javier Gómez Ortega
Beatriz Sánchez Pintado
Elisa Maggi
Alba Gutiérrez Seijo

Científicos visitantes /
Visiting Scientists:
Arto Heiskanen

Resumen de investigación

Las enfermedades neurodegenerativas (p.ej. Parkinson [EP], Huntington, etc) cada vez son de mayor incidencia en países desarrollados, al aumentar la expectativa de vida. 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: 1) Células troncales neurales (NSCs), propias de tejido nervioso; 2) Células troncales derivadas de la masa celular interna del blastocisto (las llamadas “células madre embrionarias”, hESC), 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 ESC pero reprogramadas desde células somáticas del adulto.

En concreto, nos interesa el estudio de los mecanismos de auto-renovación de estas células, en especial de NSCs, y su desarrollo hacia células maduras. En el caso de neuronas, estamos particularmente interesados en el fenotipo Dopaminérgico, y así poder aplicar estas células en el desarrollo de potenciales terapias en modelos de EP. Otro aspecto que nos interesa es el modificar genéticamente estas NSCs e iPSCs, para convertirlas en “bombas biológicas” de factores terapéuticos, o bien conseguir “instruirlas/enseñarlas”, de forma que generen los tipos celulares deseados tras su implante. Desde el punto de vista de desarrollos tecnológicos, estamos implantando la edición génica (ZFNs, CRISPR/Cas9) llevada a cabo mediante recombinación homóloga en células humanas, desarrollando nanoherramientas para el estudio de la biología básica de las células *in vitro* e *in vivo*, y finalmente estudiando el paralelismo entre cambios neurodegenerativos en el sistema nervioso central (cerebro) y periférico (entérico) con objeto de identificar nuevos biomarcadores de detección y progresión de la EP.

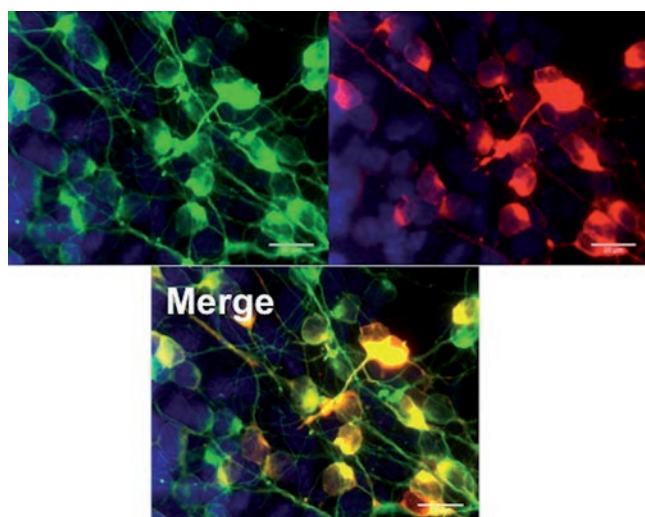


Figura 1. Generación de neuronas dopaminérgicas humanas a partir de células troncales neurales.

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 developed countries, due to the increase in life expectancy. In some cases, like Parkinson (PD), Huntington diseases, pharmaceutical drugs are useful at early stages, but none of them really cure the disease, since they do not halt the neuronal atrophy and death processes. In this context, research on the basic biology of human neural stem cells (hNSCs) 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) hNSCs obtained from foetal or adult human tissue, and thus instructed as neural cells; 2) Embryonic stem cells derived from the inner cell mass of the blastocyst (hESCs), from which NSCs can be derived; and 3) Induced pluripotent stem cells (hiPSCs), reprogrammed from somatic adult cells.

Our research focus is on the 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 genetic modification of the intrinsic properties of the hNSCs, 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. On going technological advancements include gene editing through homologous recombination (ZFNs, CRISPR/Cas9), development of nanotools to study hNSCs biology in vitro and in vivo, and the study of the parallelism between changes occurring in the Central vs. the Peripheral Nervous System (brain vs. enteric neurons) to identify new and early biomarkers of PD progression, and for diagnosis.

Publicaciones / Publications

Formentini L, Pereira MP, Sánchez-Cenizo L, Santacatterina F, Lucas JJ, Navarro C, Martínez-Serrano A and Cuezva JM (2013) *In vivo* inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *EMBO Journal*, **33**,762-78.

Krabbe C., Bak ST, Jensen P., Linstow C, Martínez-Serrano A, Hansen C and Meyer M (2014) Influence of oxygen tension on dopaminergic differentiation of human fetal stem cells of midbrain and forebrain origin. *PLoS One*, **9**:e96465.

Amato, L., Heiskanen, A., Caviglia, C., Shah, F., Zór, K., Skolimowski, M., ... & Emnéus, J. (2014). Pyrolysed 3D-Carbon Scaffolds Induce Spontaneous Differentiation of Human Neural Stem Cells and Facilitate Real-Time Dopamine Detection. *Advanced Functional Materials*, **24**(44), 7042-7052.

Erichsen JL, Blaabjerg M, Thomasen HB, Martínez-Serrano A and Meyer M (2014) Group I metabotropic Glutamate Receptors: A potential target for regulation of proliferation and differentiation of human neural stem cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014 Sep 12.

Zor, K., Heiskanen, A., Caviglia, C., Vergani, M., Landini, E., Shah, F., ... & Emnéus, J. (2014). A compact multifunctional microfluidic platform for exploring cellular dynamics in real-time using electrochemical detection. *RSC Advances*, **4**(109), 63761-63771.

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:*
 Lourdes Ruiz Desviat

Personal Científico / *Scientific Staff:*
 Belén Pérez Gonzalez
 Pilar Rodríguez-Pombo
 Eva María Richard Rodríguez
 Alejandra Gámez Abascal

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
 Sandra Arduim Brasil
 Jon Gil Ranedo

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:*
 Lorena Gallego Villar
 Celia Medrano Rodríguez
 Alfonso Oyarzábal Sanz
 Patricia Yuste Checa

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance:*
 Isabel Manso Gavilán

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
 Irene Bravo Alonso
 Ainhoa Martínez Pizarro
 Ana Rivera Barahona
 Ana Oliveira Fernández
 Álvaro Briso-Montiano Pastrana
 Alba Marín Moreno
 Cristina Martínez Ostalé
 Javier Santos
 Paula Díaz Fernández

Científicos Visitantes / *Visiting Scientists:*
 Cynthia Amorosi (CEMECO
 (Hospital de Niños, Córdoba, Argentina)
 Maja Stojiljkovic
 (IMGGE, Belgrado, Serbia)
 Kristell Klaassen
 (IMGGE, Belgrado, Serbia),
 Paula Fernández Guerra
 (Universidad de Aarhus, Dinamarca)

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 y la fisiopatología de diferentes enfermedades neurometabólicas, con el objetivo de identificar dianas terapéuticas y desarrollar nuevos tratamientos. Utilizando técnicas de secuenciación masiva (exomas y paneles de genes) se han identificado nuevos genes responsables de enfermedad y desarrollado una estrategia diagnóstica rápida y de alta sensibilidad. En el laboratorio utilizamos modelos celulares de enfermedad (fibroblastos de pacientes) así como modelos murinos (ratón hipomorfo modelo de acidemia propiónica). Recientemente hemos generado células iPS a partir de fibroblastos de pacientes con acidemias orgánicas (Figura 1) que serán diferenciados a linajes celulares relevantes para cada enfermedad (hepatocitos, precursores neuronales, cardiomiocitos).

Hemos analizado el efecto de mutaciones de tipo missense en aciduria metilmalónica tipo cblB y en un defecto congénito de glicosilación (PMM2-CDG), revelando un defecto en el plegamiento y estabilidad de la proteína, lo que ha conducido a la búsqueda e identificación de chaperonas farmacológicas para el tratamiento de estas enfermedades. Se ha desarrollado un sistema in vivo en modelos murinos para analizar la eficacia en enfermedades metabólicas del tratamiento con oligonucleótidos antisentido moduladores de splicing (Figura 2). Asimismo, se ha analizado la disfunción mitocondrial subyacente a varias enfermedades, revelando un aumento en los niveles de ROS y apoptosis, que produciría la alteración en la morfología y en la respiración mitocondrial, daño oxidativo y otras alteraciones observadas en las células de los pacientes y/o en el modelo murino. Por otra parte se han identificado una serie de miRNAs desregulados en distintos tejidos del ratón hipomorfo modelo de acidemia propiónica que regulan la expresión de genes implicados en apoptosis, vías de señalización de estrés, neurodegeneración y cardiopatías que podrían tener una implicación en la fisiopatología de la enfermedad.

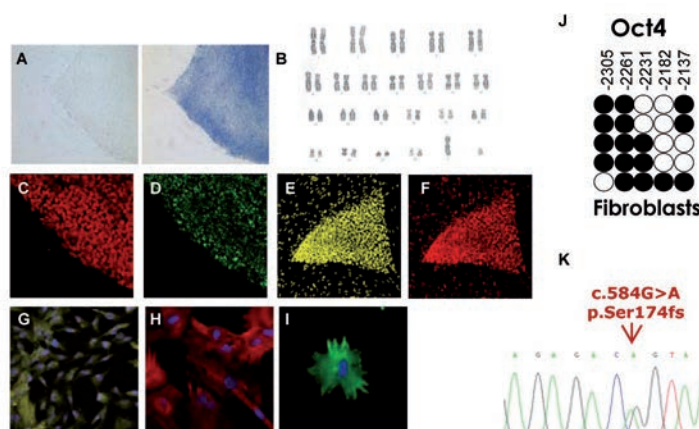


Figura 1. Caracterización de células iPS derivadas de un paciente MMA cblB. A) Tinción para actividad fosfatasa alcalina B) Cariotipo normal C-F) Tinción positiva para marcadores de pluripotencia. G-I) Inmunofluorescencia de iPSc diferenciadas in vitro para mostrar el potencial de generación de las tres capas de líneas germinales J) Análisis de metilación del promotor OCT4 K) Presencia de la mutación del paciente en las iPSc.

Figure 1. Generation and characterization of MMA cblB type patient-specific iPSC lines. A). Patient iPSC stained for alkaline phosphatase activity. B). Normal karyotype of patient iPSC cell line. C-F). Representative colonies of patient iPSC stained positive for the pluripotency-associated markers. G-I). Immunofluorescence analysis of iPSC differentiated in vitro showing the potential to generate cell derivatives of all three primary germ cell layers. J). Methylation analysis of the OCT4 promoter by bisulphite sequencing. K). Direct sequencing of genomic DNA from patient iPSC identifying the mutations.

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 in the research of the molecular basis and physiopathology of different neurometabolic diseases, with the aim of identifying therapeutic targets and developing new treatment strategies. Using next generation sequencing strategies (exomes and gene panels) we have identified novel genes responsible for disease and developed a highly sensitive and efficient diagnostic strategy. In the lab we use cellular models of disease (patients' fibroblasts) and animal models (hypomorph mouse model of propionic acidemia). Recently we have generated iPSC from fibroblasts from patients with organic acidemias (Figure 1) which will be differentiated to cellular lineages relevant for the disease (hepatocytes, neuronal precursors, cardiomyocytes).

We have analyzed the effect of missense mutations in methylmalonic aciduria cblB type and in a congenital defect in glycosylation (PMM2-CDG), revealing a folding defect and decreased stability of the protein. This has led to the screening and identification of pharmacological chaperones potentially suitable for the treatment of these diseases. We have developed an *in vivo* model in mice for testing splice switching antisense oligonucleotide treatment in metabolic diseases (Figure 2). In addition we have analyzed mitochondrial dysfunction present in several disorders revealing an increase in ROS and apoptosis levels resulting in altered mitochondrial morphology and respiration, oxidative damage and other alterations observed in patient cells and in the murine model. We have identified a set of miRNAs which are deregulated in different tissues of the hypomorph mouse model of propionic acidemia. The targets of these miRNAs are genes involved in apoptosis, stress signaling, neurodegeneration and cardiomyopathy which could be involved in the physiopathology of the disease.

Publicaciones / Publications

- Pérez, B., Medrano, C., Ecay, M.J., Ruiz-Sala, P., Martínez-Pardo, M., Ugarte, M., Pérez-Cerdá, C. (2013). *J Inherit Metab Dis*. **36**(3):535-42.
- Gallego-Villar L, Pérez-Cerdá C, Pérez B, Abia D, Ugarte M, Richard E, Desviat LR. (2013). *J Inherit Metab Dis*. **36**(5):731-40.
- Oyazabal A, Martínez-Pardo M, Merinero B, Navarrete R, Desviat LR, Ugarte M, Rodríguez-Pombo P. (2013). *Hum Mutat* **34**(2):355-62.
- Palanca D, García-Cazorla A, Ortiz J, Joui C, Cusi V, Suñol M, Rives S, Perez B, Ormazabal A, Fowler B, Artuch R. (2013). *J Inherit Metab Dis* **8**:57-62.
- Richard E, Desviat LR, Ugarte M, Pérez B (2013). *J Cell Biochem* **114**(1) 183-191.
- Pérez B, Gutiérrez-Solana L, Verdú A, Merinero B, Yuste-Checa P, Ruiz-Sala P, Calvo R, Jalañ A, López-Marín L, Campos O, Ruiz MA, San Miguel M, Vázquez M, Castro M, Ferrer I, Navarrete R, Desviat LR, Lapunzina P, Ugarte P, Pérez-Cerdá C. (2013). *Epilepsia* **54**(2) 239-248.
- Amoroso C., Vallespin E., Fernández L., Arrabal L.F., Desviat L.R., Pérez B., Santos F., Solera J. (2013). *Gene* **S0378-1119**(13) 124-128.
- Lubrano R, Belli E, Gentile I, Paoli S, Carducci C, Santagata S, Pérez B, Ugarte M, Labriola D, Elli M. (2013). *Am J Transplant* **13**(7):1918-22.
- Bueno M, González-Lamuño D, Delgado-Pecellín C, Aldámiz-Echevarría L, Pérez B, Desviat LR, Couce ML (2013). *J Hum Genet* **58**(5):279-84.
- Couce ML, Bóveda MD, Fernández-Marmiesse A, Mirás A, Pérez B, Desviat LR, Fraga JM (2013). *Gene* **521**(1):100-104.
- Jorge-Finnigan A, Brasil S, Underhaug J, Ruiz-Sala P, Merinero B, Banerjee R, Desviat LR, Ugarte M, Martínez A, Pérez B. (2013). *Hum Mol Genet* **22**(18):3680-9.
- Parini R, Furlan F, Brambilla A, Codazzi D, Vedovati S, Corbetta C, Fedeli T, Merinero B, Pérez B, Ugarte M (2013). *J Inherit Metab Dis* **11**:133-137.
- Tondo M, Calpena E, Arriola G, Sanz P, Martorell L, Ormazabal A, Perez-Dueñas B, Pérez-Cerdá C, Castejón E, Palacin M, Ugarte M, Espinos C, Perez B, Artuch R (2013). *Mol Genet Metab* **S1096-7192**(13):223-30.
- Ortiz C., Joui C., Cortés-Saladellafont E., Morenod J., Pérez A., Ormazabal A., Pérez-Cerdá C., Pérez B., Artuch R., Cusi V., García-Cazorla A. (2013). *Gene* **S0378-1119**(13):1066-1074.
- Pérez-Carro R, Sánchez-Alcudia R, Pérez B, Navarrete R, Pérez-Cerdá C, Ugarte M, Desviat LR (2014). *Clin Genet* **86**(2):167-71.
- Lubrano R, Pérez B, Elli M. (2013). *Pediatr Nephrol* **28**:2067-2068.
- Trujillano D, Perez B, González J, Tornador C, Navarrete R, Escaramis G, Ossowski S, Armengol L, Comejo V, Desviat LR, Ugarte M, Estivill X. (2014). *Eur J Hum Genet* **22**(4):528-34.
- Pérez B, Vilageliu L, Grinberg D, Desviat LR. (2014). *Nucl Acid Ther* **24**(1):48-56.
- García-Cazorla A, Oyazabal A, Fort J, Robles C, Castejón E, Ruiz-Sala P, Bodo S, Merinero B, Lopez-Sala A, Dopazo J, Nunes V, Ugarte M, Artuch R, Palacin M, Rodríguez-Pombo P (2014). *Hum Mutat*. **35**(4):470-7.
- Castro M, Carrillo R, García F, Sanz P, Ferrer I, Ruiz-Sala P, Vega AI, Ruiz Desviat L, Pérez B, Pérez-Cerdá C, Merinero B, Ugarte M. (2014). *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **33**(4-6):233-240.
- Lacasa Maseri A, Yun Castilla C, Mota Ybancos JL, Rodríguez-Pombo P (2014). *Med Clin (Barc)*. **143**(9):423-4.
- Ortigoza-Escobar JD, Serrano M, Molero M, Oyazabal A, Rebollo M, Murchart J, Artuch R, Rodríguez-Pombo P, Pérez-Dueñas B. (2014). *Orphanet J Rare Dis* **9**:92.
- Fernández-Guerra P, Birkler RI, Merinero B, Ugarte M, Gregersen N, Rodríguez-Pombo P, Bross P, Palmfeldt J. (2014). *Mol Genet Genomic Med*. **2**(5):383-92.
- Matos L, Canals I, Dridi L, Choi I, Prata MJ, Jordan P, Desviat LR, Pérez B, Pshezhetsky AV, Grinberg D, Alves S, Vilageliu L (2014). *Orphanet J Rare Dis* **Dec 10**;9(1):180.
- Gallego-Villar L, Pérez B, Ugarte M, Desviat LR, Richard E (2014). *Biochem Biophys Res Commun*. **452**(3):457-61.
- Gallego-Villar L, Viecelli HM, Pérez B, Harding CO, Ugarte M, Thöny B, Desviat LR. (2014). *Mol Ther Nucleic Acids*. **3**:e193.

Patentes / Patents

B. Perez, A. Jorge-Finnigan, L. R. Desviat, A. Martinez, J. Underhaug, M. Ugarte. Compuestos útiles en el tratamiento de la aciduria metilmalónica/ compounds useful in the treatment of methylmalonic aciduria. 201330171 (ES2485540A1), 61763012 (USA). Fecha de publicación: 13 de agosto 2014. Entidades titulares de la patente: Universidad Autónoma de Madrid, Universidad de Bergen y Universidad de Michigan.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Sandra Brasil (2013). New targets and therapeutics approaches in inherited metabolic disorders. Universidad de Lisboa. Directores: B. Pérez, I Rivera, P Leandro.

Paula Fernández-Guerra (2014). Cellular characterization of human dermal fibroblasts, focus on mitochondria and maple syrup urine disease. Universidad de Aarhus (Dinamarca). Directores: P. Bross, J. Palmfeldt, P. Rodríguez-Pombo.

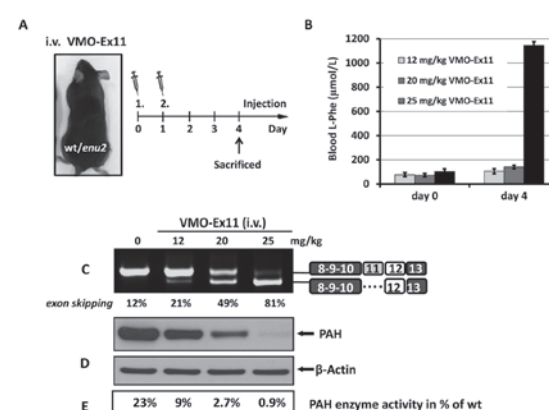


Figura 2. Tratamiento con oligonucleótidos antisentido moduladores de splicing en ratones *Pah^{enu2}*. A) Los ratones fueron inyectados i.v. consecutivamente con VMO-ex11 en las dosis indicadas y sacrificados 4 días tras la primera inyección. B) Niveles de L-Phe en sangre. C) Análisis por RT-PCR del mRNA de la *Pah* en hígado, D) proteína PAH por Western blot y E) Actividad enzimática relativa a un control. (Gallego-Villar et al. 2014).

Figure 2. Antisense oligonucleotide treatment in *Pah^{enu2}* mice. (A) Mice were treated with i.v. injections with VMO-ex11 at the indicated doses and sacrificed at day 4 after the first injection. (B) Blood L-Phe levels, (C) RT-PCR analysis of *Pah*-mRNA from liver, and (D) Western blot analysis showing PAH protein levels in liver. (E) PAH enzyme activity relative to control wild-type levels. (Gallego-Villar et al. 2014).

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:
Laura Contreras Balsa
Irene Llorente Folch
(Desde julio 2013)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ignacio Amigo de la Huerza
(Hasta abril 2013)
Irene Llorente Folch
Carlos B. Rueda Díaz
Paloma González Sánchez
Paula Martínez Valero

Carmen Rubio Caballero
Inés Juaristi Santos (Desde julio 2013)

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Bárbara Sesé Cobos
Isabel Manso Gavilán
Alejandro Arandilla (Hasta enero 2013)

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Alba del Río Lorenzo (Hasta junio 2013)
Andrea Montero Atalaya (Hasta junio 2014)
Ana Lamuedra Garijo (Octubre 2013-junio 2014)
Sara Laine Menéndez (Octubre 2013-junio 2014)
Rubén Juvera (Junio-septiembre 2013)
David Álvarez Cillerros (Enero-junio 2014)
Sergio García-Moreno Alcántara
(Hasta junio 2013)
Guillermo Puertas (Desde noviembre 2014)

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Araceli del Arco Martínez
(Universidad de Castilla-La Mancha)

Resumen de investigación

La entrada de Ca^{2+} en la mitocondria a través del uniportador de Ca^{2+} es importante para la señalización por Ca^{2+} pero su persistencia en la mitocondria se ha asociado con disfunción mitocondrial y muerte celular. Estamos interesados en el estudio de sistemas mitocondriales de señalización por Ca^{2+} que no requieran su entrada en el orgánulo: los transportadores mitocondriales de aspartato-glutamato (AGC) aralar y citrina, componentes de la lanzadera de malato-aspartato (MAS) y los de ATP-Mg/Pi, o SCaMCs. Ambos se activan por Ca^{2+} extramitocondrial regulando el transporte de metabolitos y la funcionalidad mitocondrial. Nos hemos centrado en su papel en la regulación de la respiración en células intactas y en la regulación de los niveles de aspartato y glutamato cerebrales y su tráfico cerebral. Hemos encontrado que estos transportadores, en particular AGC1/Aralar, son esenciales en neuronas en cultivo para la respiración mitocondrial basal y para su estimulación en respuesta a diferentes cargas de trabajo.

El ratón KO para AGC1/Aralar recapitula muchas características de la deficiencia humana en AGC1, incluyendo niveles cerebrales muy bajos de N-acetil-aspartato, hipomielinización y convulsiones. Propusimos que en cerebro la síntesis de glutamato y glutamina en las células gliales requiere del aspartato producido en las neuronas, y recientemente hemos verificado esta propuesta en retina, encontrando que la síntesis de glutamina en las células de Müller depende del flujo transcelular de aspartato desde los fotorreceptores. Estas nuevas funciones de AGC1/Aralar-MAS en el tráfico intra- e inter-celular de aminoácidos pueden servir de base para nuevas estrategias terapéuticas en esta y otras enfermedades cerebrales.

El envejecimiento se caracteriza por la presencia de resistencia a insulina y leptina, y enfermedad cardiovascular. Nuestro trabajo se centra en dos aspectos principales: 1) Las variaciones de la función cardíaca con la edad y la influencia de la restricción calórica moderada; y 2) Los cambios con la edad en los efectos de CCK, tanto de saciedad como de sensibilización a insulina y la posibilidad de revertir dichos cambios.

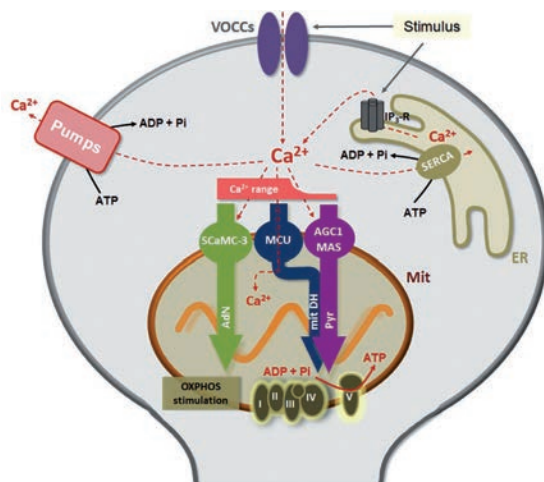


Figura 1. El uniportador de calcio mitocondrial (MCU) y los transportadores de metabolitos dependientes de calcio, SCaMCs y AGCs, median la señalización por Ca^{2+} a la mitocondria. MCU y SCaMCs son activados por concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ en el rango μM mientras que los AGCs requieren concentraciones menores de Ca^{2+} citosólico, sobre 100-300 nM, para su activación.

Figure 1. Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU) and Ca^{2+} -regulated mitochondrial carriers, SCaMCs and AGCs, mediate Ca^{2+} -signalling to mitochondria. MCU and SCaMCs are activated by cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ at μM range whereas AGCs require lower cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ about 100-300 nM for activation.

Research summary

Ca^{2+} entry in mitochondria through the Ca^{2+} uniporter is important in cell Ca^{2+} signaling, but its persistence in mitochondria is associated with mitochondrial dysfunction and cell death. We are interested in the study of systems for Ca^{2+} signaling in mitochondria that do not require Ca^{2+} entry in the organelle: the mitochondrial carriers of aspartate-glutamate (AGC) aralar and citrin, components of the malate aspartate shuttle (MAS), and those of ATP-Mg/Pi, or Short CaMCs (SCaMCs) which sense extramitochondrial Ca^{2+} to regulate metabolite transport and mitochondrial functionality. We have focused on their role in regulating respiration in intact cells and in the regulation of brain aspartate and glutamate levels and traffic. We found that these transporters, particularly AGC1/Aralar, are essential for basal mitochondrial respiration of intact cultured neurons and for the Ca^{2+} dependent stimulation of respiration in response to different workloads.

The AGC1/Aralar KO mouse recapitulates many features of human AGC1 deficiency including very low levels of brain N-acetyl-aspartate, hypomyelination and seizures. We proposed that in brain, glial glutamate and glutamine synthesis requires aspartate produced in neurons, and we have now verified this proposal within the retina, finding that glutamine synthesis in Müller glial cells depends on the transcellular flux of aspartate from photoreceptors. These new functions of AGC1/Aralar-MAS in intra- and intercellular traffic of amino acids may set the basis for new therapeutic strategies in this and other brain disorders.

Aging is characterized by insulin and leptin resistance, and cardiovascular disease. We focus our work in two aspects: 1) Changes in heart function in aged rats fed ad libitum or after 3-months of moderate caloric restriction; and 2) Changes in CCK satiating and insulin sensitizing effects looking for possible mechanisms involved in the development of insulin resistance with aging and its reversion.

Publicaciones / Publications

Llorente-Folch, I., Sahún, I., Contreras, L., Casarejos, M.J., Grau JM, Saheki, T., Mena, M.A., Satrustegui, J., Dierssen M. and Pardo, B. (2013) AGC1-malate aspartate shuttle activity is critical for dopamine handling in the nigrostriatal pathway. *J. Neurochem.* **124**, 347-362.

Amigo, I., Traba, J., González-Barroso, M.M., Rueda, C.B., Fernández, M., Rial, E., Sánchez, A., Satrustegui, J. and del Arco, A. (2013) Glucagon regulation of oxidative phosphorylation requires an increase in matrix adenine nucleotide content through Ca^{2+} activation of the mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SCaMC-3. *J. Biol. Chem.* **288**, 7791-7802.

Llorente-Folch, I., Rueda, C.B., Amigo, I., del Arco, A., Saheki, T., Pardo, B. and Satrustegui, J. (2013) Calcium-regulation of mitochondrial respiration maintains ATP homeostasis and requires ARALAR/AGC1-malate aspartate shuttle in intact cortical neurons. *J. Neurosci.* **33**, 13957-13971.

Du, J., Cleghorn, W., Contreras, L., Linton, J.D., Chan, G.C., Chertov, A.O., Saheki, T., Govindaraju, V., Sadilek, M., Satrustegui, J., Hurley, J.B. (2013) Cytosolic reducing power preserves glutamate in retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 18501-18506.

Pla-Martín, D., Rueda, C.B., Estela, A., Sánchez-Piris, M., González-Sánchez, P., Traba, J., de la Fuente, S., Scorrano, L., Renau-Piqueras, J., Alvarez, J., Satrustegui, J. and Palau, F. (2013) Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca^{2+} homeostasis by reducing store-operated Ca^{2+} entry. *Neurobiol. Dis.* **55**, 140-151.

Du J, Cleghorn WM, Contreras L, Lindsay K, Rountree AM, Chertov AO, Turner SJ, Sahaboglu A, Linton J, Sadilek M, Satrustegui J, Sweet IR, Paquet-Durand F, Hurley JB. (2013) Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by zaptinast causes massive accumulation of aspartate at the expense of glutamate in the retina. *J. Biol. Chem.* **288**, 36129-36140.

Pardo B, Contreras L, Satrustegui J. (2013) De novo Synthesis of Glial Glutamate and Glutamine in Young Mice Requires Aspartate Provided by the Neuronal Mitochondrial Aspartate-Glutamate Carrier Aralar/AGC1. *Front. Endocrinol.* **4**, 149.

Rueda, C.B., Llorente-Folch, I., Amigo, I., Contreras, L., González-Sánchez, P., Martínez-Valero, P., Juaristi, I., Pardo, B., del Arco, A. and Satrustegui, J. (2014) Ca^{2+} regulation of mitochondrial function in neurons. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 1617-1624.

Lindsay, K.J., Du, J., Sloat, S.R., Contreras, L., Linton, J.D., Turner, S.J., Sadilek, M., Satrustegui, J. and Hurley, J.B. (2014) Pyruvate kinase and aspartate-glutamate carrier distributions reveal key metabolic links between neurons and glia in retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15579-15584.

Granado, M., Rubio, C., Amor, S., Monge, L., Fernández, N., Carreño-Tarragona, G., Carrascosa, J.M. and García-Villalón ÁL. (2014) Effects of age and caloric restriction on the cardiac and coronary response to endothelin-1 in rats. *Exp. Gerontol.* **60**, 183-189.

del Arco, A. and Satrustegui, J. (March 2013) Mitochondrial Carriers. In: eL.S. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Ignacio Amigo de la Hueriga (2013). "Characterization of SCaMC-3, the mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier present in liver and brain". UAM. Jorgina Satrustegui y Araceli del Arco.

Irene Llorente Folch (2013). "New roles of aralar, the brain mitochondrial aspartate/glutamate carrier in dopamine handling glutamate excitotoxicity and regulation of mitochondrial respiration". UAM. Jorgina Satrustegui y Beatriz Pardo.

Carlos B. Rueda Díez (2014). " Ca^{2+} modulation of mitochondrial function under physiological and pathological stimulation: Role of the ATP-Mg/Pi carrier, SCaMC-3". UAM. Jorgina Satrustegui, Beatriz Pardo y Araceli del Arco.

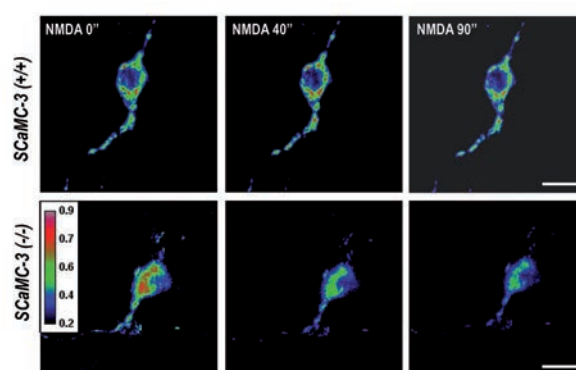


Figura 2. Imágenes representativas de neuronas, obtenidas de ratones silvestres y deficientes en el transportador SCaMC-3, transfectadas con la sonda mitocondrial GO-ATeam-2 para monitorizar variaciones en los niveles mitocondriales de ATP tras la adición de NMDA.

Figure 2. Representative images of WT and SCaMC-3 KO neurons transfected with the mitochondrial FRET-based ATP probe GO-ATeam-2 to monitor changes in mitochondrial ATP levels after NMDA exposure.

Mecanismos moleculares de neurogeneración

Molecular mechanisms of neurodegeneration

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 Ordóñez Gutiérrez (CIBERNED)
Jorge Cabrera (2010-2014)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
María Escoll
Irene Benito

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Marta Antón (2010-2013) (CIBERNED)

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Paula Martínez Valero (2012-2013)
Sergio Gómez López (2012-2013)
Laura López Sanz (2012-2013)
Silvia Crespo Pomar (2012-2013)
José Luis Herrera Álvarez (2014)
Centro Invest. Bioméd. Canarias (CIBICAN)
Iván Fernández Pérez (2014-2015)

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Laura Mateos-Montejo (2012-Sept-2014)
Ricardo Gargini (2012-2014)

Resumen de investigación

Nuestro grupo está interesado en una serie de enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Isquemia cerebral o tumores cerebrales que están mayoritariamente asociados con la edad. Podríamos considerar que la “vida promedio” de una especie o su longevidad, es en cierta manera especie-específica, y sobre esta edad promedio diferentes factores, ambientales (directamente ambientales o asociados a la dieta) o genéticos, pueden modificar ese proceso de “envejecimiento normal”. Hay por tanto una pregunta abierta... “¿hay mecanismos moleculares comunes en estas patologías dependientes de la edad?”. Los datos de diversos modelos animales apoyan la idea que la longevidad está controlada por vías de señalización genéricas, por ejemplo la vía de IGF1/Insulin-PI3K-Akt-FoxO. Datos publicados indican que insulina/IGF-1 regulan longevidad de una manera análoga a lo largo de la escala filogenética. Así, IGF-1/Insulina a través de sus receptores quinasa de tirosina controla la actividad de la lipido-quinasa PI3K y varias quinasas del tipo serina-treonina tales, como Akt.

Nuestro grupo está interesado en patologías asociadas con la edad, enfocándose principalmente en el papel de la vía de señalización que se inicia en PI3K-Akt. Nuestros estudios iniciales se centraron en GSK3 y en Akt, y definimos el papel de las isoformas de GSK3 y de las isoformas de Akt en el morfogenesis neuronal; y cómo esta vía PI3K-Akt se modifican después de procesos de Isquemia. Definimos el papel protector de neurosteroides, tales como estradiol, y describimos, que al menos en parte, es debido a la activación de esta vía PI3K-Akt. En segundo lugar, estamos analizando el papel de elementos por debajo de Akt, como mTORC1. La actividad quinasa de este complejo proteico regula, al menos la síntesis de la proteína y el proceso de autofagia; mientras que su disfunción se ha propuesto como un factor determinante en la generación y/o la degradación del péptido beta-amiloide, en la enfermedad de Alzheimer. En tercer lugar estamos interesados en algunos elementos regulados por Akt (tales como FoxO y Bim), ya que nuestros datos indicaron que son responsables, del control de la división de células troncales tumorales... y del mantenimiento de su fenotipo “troncal-tumoral”. Nuestro trabajo ahora se está centrando el estudio de la conversión astrocito-astrocitoma-glioma y estamos tratando de definir qué elementos controlados por Akt podrían regular esta conversión y como se traduce en la pérdida de la función citoesqueleto/funcionalidad celular.

Resumiendo, nos estamos centrando en la vía y los elementos que controlan el proceso fisiológico, de la división de célula a la diferenciación, y cómo algunas de estas proteínas de PI3K-Akt se modifican en patología.

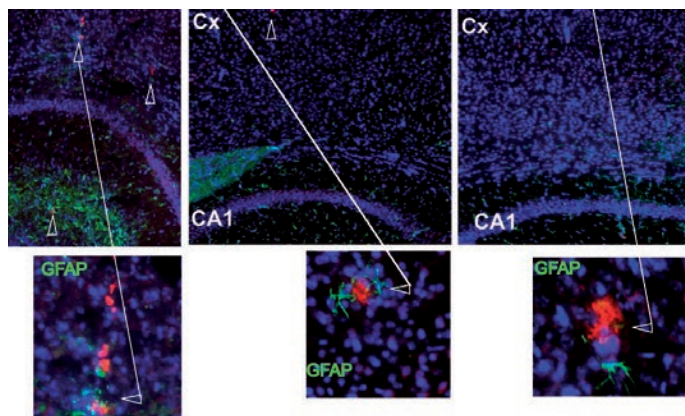


Figura 1. Esquema del tratamiento de los ratones transgénicos APP/PS1 y del análisis de la carga amiloide (β A1-40 y β A1-42) y niveles de tau fosforilados, con los diferentes liposomas usados.

Figure 1. Scheme of the treatment of APP/PS1 transgenic mice with different used liposomes and of the analysis of the amyloid burden (β A1-40 and β A1-42) and fosforilados levels of tau.

Research summary

Our group mostly interested in neurodegenerative disorders is now focusing in a group of brain disorders associated with aging, such as Alzheimer, disease, Stroke and some type of brain tumours. In fact, we could consider that life-span or longevity is in some way specie-specific, and in addition can be affected by environment changes or mutations in simple genes. Thus one open question is ... are there common molecular mechanisms underlying the age-dependency of several disorders?. Data from different animal models strongly support that idea that longevity is controlled by several genetic pathways, such as: IGF1/Insulin-PI3K-Akt-FoxO. Some reports indicate that insulin and IGF-1 regulate longevity in a conserved manner. IGF-1/Insulin through their tyrosine kinase receptors controls the activity of Class1 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and several serine-threonine kinases such as Akt.

We are interested in the analysis of the molecular mechanisms of some brain disorders, mainly focusing in the role of PI3K-Akt and some of the Akt substrates, trying to understand the key points of these processes. Our initial studies were focused on GSK3 and in Akt, we defined the role of GSK3 and Akt isoforms in the neuronal morphogenesis and how they are modified after Ischemia. We defined how the neuroprotective role of neurosteroids, such as estradiol, is due to the activation of PI3K-Akt pathway, at least in part. Second, we are analysing the role of the Akt downstream element, mTORC1. The kinase activity of this protein complex control, at least in part, protein synthesis and autophagy; whereas its dysfunction has been considering a key factor of beta amyloid generation and/or degradation in Alzheimer disease. Third, we are analysing some Akt-downstream elements (such as FoxO and Bim), and our data indicated that they are responsible of the cell division of cancer-stem cells and the maintenance of its phenotype. Our work is now focusing on the conversion from astrocyte-astrocytoma-glioma trying to define the role Akt-downstream elements and the regulation of cytoskeleton/cellular function.

In summary, we are focusing on track PI3K-Akt signalling and elements that control some physiological process, from cell division to differentiation, and how some of these proteins are modified in pathology.

Publicaciones / Publications

Marta Bolos, Lara Ordoñez-Gutiérrez, Francisco Wandosell, Isidro Ferrer, Eva Carro (2013) "Neurogenic effects of β Amyloid in the choroid plexus epithelial cells in Alzheimer disease" *Cellular and Mol. Life Sci*;70(15):. 2787-97.

Lara Ordoñez-Gutiérrez, Juan María Torres, Rosalina Gavín, Marta Antón, Ana Isabel Arroba-Espinosa, Juan-Carlos Espinosa, Cristina Vergara, José A. del Río and Francisco Wandosell (2013) "Cellular Prion protein (PrPC) modulates β -amyloid deposition in aged APP/PS1 transgenic mice" *Neurobiology of Aging*, 34 : 12 , 2793-804

Banon-Rodríguez I, Saez de Guinoa, J, Bernardini, A, Ragazzini, C, Fernandez, E, Carrasco,Y.R., Jones, G., E., Wandosell, F. and Anton I.. (2013) "WIP Regulates Persistence of Cell Migration and Ruffle Formation in Both Mesenchymal and Amoeboid Modes of Motility" *PLoS ONE* 8(8):e70364.

Ana del Puerto, Francisco G Wandosell, Juan José Garrido (2013) "Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 28;7:197.

M.J. Benitez, D. Sanchez-Ponce, J.J. Garrido and F. Wandosell. (2014) "Hsp90 activity is necessary to acquire a proper neuronal polarization" *Molecular Cell Research -BBA* 1843: 2- 245-52.

D. Simon, M^a E. Herva, M.J. Benitez,,J.J. Garrido, A.I. Rojo ³, A. Cuadrado ³, J.M. Torres and F. Wandosell (2014) "Dysfunction of the PI3K-Akt-GSK-3 pathway is a common feature in cell culture and *in vivo* models of prion disease Neuropathology and *Applied Neurobiology* Apr;40(3):311-26.

M.J. Pérez-Álvarez and F. Wandosell, (2013). "Estradiol in CNS: Role in Neurodegeneration" *In Palmeri Rand Grimaudo S* (ed) Estradiol: synthesis, health effects and drug interaction, first edn. Nova, New York, 35-68

Wandosell, F. (2014). TITULO Mecanismos moleculares de la enfermedad de Alzheimer: Causas genéticas y "esporádicas". Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas. García Rodríguez, J.C. (Ed.) Barcelona, España: OmniaScience; 2014. pp.33-52. <http://dx.doi.org/10.3926/oms.124>.

Otras actividades / Other activities

Master Genética y Biología Celular (conjunto con UAM y UAH) "Envejecimiento celular". Responsables Dr^a. Rosa Sacedon y Dr^a Marta Torroba. Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología (Cursos 2012 y 2013). UCM.

Máster en Biología Molecular y Celular. Departamento de Biología Molecular (Ciencias) y Departamento de Bioquímica (Medicina) de la UAM (2012-2013, 2013-2014) Módulo: *Migración y Motilidad celular: Polaridad y diferenciación neuronal* (BM9) F. Wandosell. Coordinadoras-Dr^a. Inés Antón (Centro Nacional de Biotecnología) Dr^a. Margarita Cervera (Dpto. de Bioquímica, UAM).

Máster en Biomedicina Molecular. Departamento de Biología Molecular y de Bioquímica (UAM). Módulo: ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS (BMM6) (2012-2013, 2013-2014) Coordinadores: Dr. Javier Díaz Nido (Dpto. Biología Molecular UAM), Dr. Francisco Wandosell (CBMSO, CSIC-UAM).

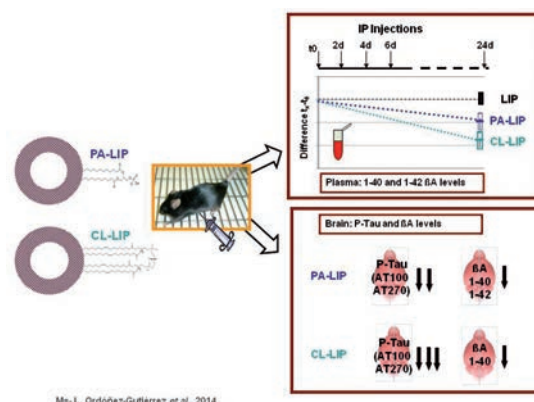
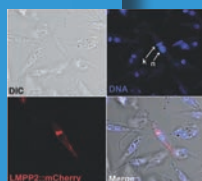


Figura 2. Reducción de la Amyloidosis tras el tratamiento con Liposomas conteniendo PA o CL, o controles (C). Inmunofluorescencia de secciones de corteza cerebral de ratones transgénico (APP/PS1) [GFAP(verde), amiloide(rojo) y nucleos (azul)]

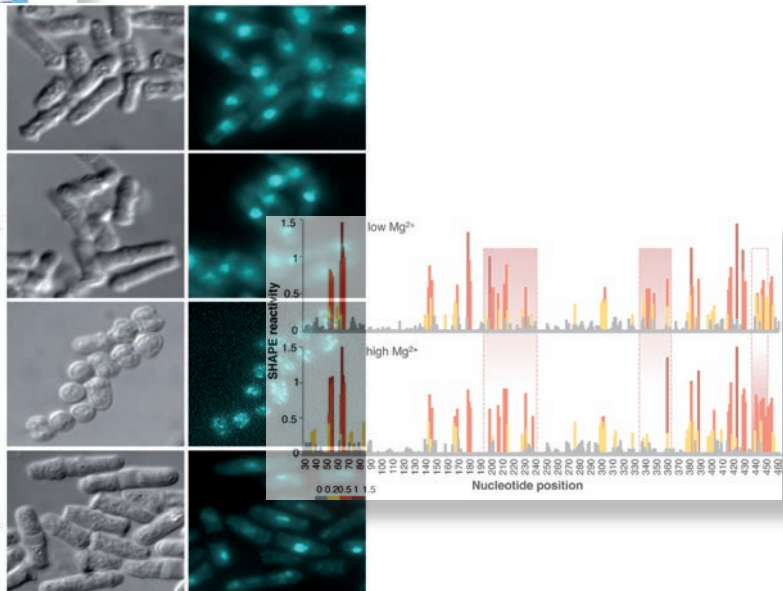
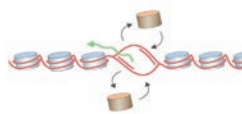
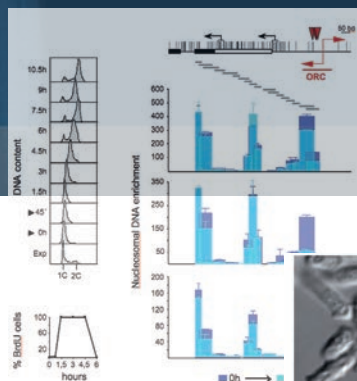
Figure 2. Reduction of Amyloidosis after Liposome treatment with containing PA or CL, or controls (C). Immunofluorescence of brain sections of APP/PS1 transgenic mice [GFAP (green), amyloid (red) and nuclei (blue)]

- 146 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
- 148 Bases moleculares de la citopatología viral y fúngica
Molecular bases of viral and fungal citopathology
LUIS CARRASCO LLAMAS
- 150 Regulación post-transcripcional de la expresión génica en eucariotas
Post-transcriptional regulation of gene expression in eukaryotes
CÉSAR DE HARO CASTELLA
- 152 Organización funcional del genoma de mamíferos
Functional organization of the mammalian genome
MARÍA GÓMEZ VICENTEFRANQUEIRA
- 154 División celular, replicación del genoma y cromatina
Cell division, genome replication and chromatin
CRISANTO GUTIÉRREZ
- 156 Iniciación interna de la traducción en mRNAs eucarióticos
Internal initiation of translation in eukaryotic mRNAs
ENCARNACIÓN MARTÍNEZ-SALAS
- 158 Regulación de la expresión génica en *Leishmania*
Regulation of gene expression in Leishmania
JOSÉ MARÍA REQUENA ROLANÍA
- 160 Replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$. Virus de la peste porcina Africana
Replication of bacteriophage $\phi 29$ DNA. African swine fever virus
MARGARITA SALAS FALGUERAS
- 162 Replicación cromosómica y estabilidad del genoma
Chromosome replication and genome stability
JOSÉ ANTONIO TERCERO ORDUÑA
- 164 Grupo Reparación del DNA bacteriano
Repair of bacterial DNA group
MIGUEL DE VEGA JOSÉ



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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
María Isabel Martínez Jiménez
Verónica Esteban Martín
Sandra Chocrón Benloulou

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ana Gómez Bedoya
Sara Inmaculada García Gómez
Ana Aza Montoya
Guillermo Sastre Moreno
Patricia Alejandra Calvo Manzano
Gustavo Carvalho Dias

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Susana Guerra González

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Alberto Díaz Talavera
Luis Blanco Franco

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Fabiana dos Santos Rando

Gestor de Investigación /
R&D Project Manager:
Estefanía Martínez Jover

Resumen de investigación

En los últimos 15 años, el grupo ha estudiado dos DNA polimerasas humanas (Pol α y Pol μ) descubiertas en nuestro laboratorio, y que están implicadas en reparación de roturas de doble cadena de DNA (DSBs) mediante reunión de extremos no homólogos (NHEJ). En los dos últimos años hemos demostrado el papel del dominio "broche" y de una red de interacciones que posibilitan la conexión de los extremos de la rotura, y el adecuado posicionamiento del Loop 1 de Pol μ durante NHEJ. También hemos determinado la validez e idoneidad del uso de NTPs como sustratos de NHEJ para Pol μ , su propensión a generar expansiones en secuencias repetidas, y su regulación mediada por fosforilación de los dominios BRCT y Loop 1 por Cdk2/ciclina A. Asimismo, hemos estudiado ortólogos de levaduras y bacterianos de estas DNA polimerasas, demostrando su implicación en translocaciones cromosómicas, y en tolerancia al daño oxidativo. En colaboración con Aidan Doherty (GSDC, Univ Sussex, UK) hemos completado la caracterización de la polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* implicada en NHEJ (PolDom), y evidenciado su paralelismo mecánico con Pol α y Pol μ . El análisis in vivo de la función de Pol α y Pol μ se está llevando a cabo mediante modelos celulares y murinos deficientes en una o en ambas enzimas, y en colaboración con Antonio Bernad (CNB, Madrid) hemos demostrado el impacto de Pol μ en inestabilidad genómica y envejecimiento.

Finalmente, hemos caracterizado una nueva primasa/polimerasa (PrimPol) en células humanas, que está implicada en tolerancia al daño durante la replicación del DNA nuclear y mitocondrial y es capaz de reiniciar cadenas de DNA bloqueadas por estrés replicativo. Estos estudios, iniciados en colaboración con Ian Holt (MRC, UK), y Juan Méndez (CNIO, Madrid), serán continuados mediante el análisis de un modelo murino de deficiencia (KO), viable, para demostrar la importancia de PrimPol en mitocondriopatías, envejecimiento y cáncer.

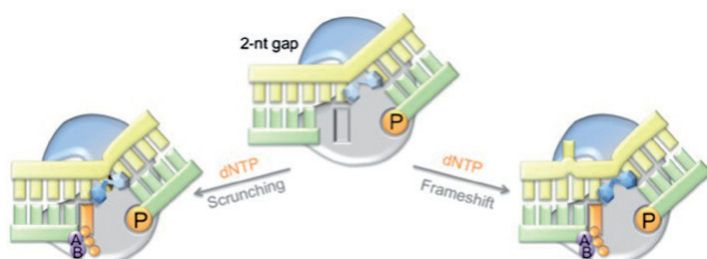


Figura 1. Selección de la base molde: papel de los residuos Phe63 y Phe64. Esquema que muestra dos opciones de PolDom para resolver gaps mayores de 1 nucleótido durante NHEJ: la cadena molde se "comprime" y el gap se rellena al completo (izquierda); la cadena molde se disloca, y se pierde secuencia al copiarse parcialmente el gap (derecha). Phe63 y Phe64 se representan como hexágonos azules que mantienen "doblado" el DNA (amarillo).

Figure 1. Selecting the Templating Base: Roles of Residues Phe63 and Phe64. A cartoon showing the dichotomy that PolDom confronts when dealing with gaps longer than 1 nt during NHEJ: the template strand is either "scrunched," and the gap filled-in correctly (left side), or the template strand is dislocated and sequence is lost with the production of frameshifts (right side). Phenylalanines Phe63 and Phe64 are shown as blue hexagons holding the kink in the DNA substrate (yellow).

Research summary

Since the last 15 years, our group studies two eukaryotic DNA polymerases (Pol λ and Pol μ), discovered in Blanco laboratory, that are involved in DNA double-strand break repair (DSBs) by nonhomologous end joining (NHEJ). In the last two years we showed the role of a specific motif ("brooch") and a network of conserved interactions that facilitate both end-bridging at the DSB, and the adequate positioning of Loop1 during NHEJ by Pol μ . We also demonstrated that NTPs are ultimate Pol μ substrates during NHEJ, the propensity of Pol μ to generate nucleotide expansions on iterative sequences, and its regulation via phosphorylation of BRCT and Loop 1 by Cdk2-cyclinA. We also studied the yeast and bacterial orthologues of these human polymerases, demonstrating a direct role in chromosomal translocations and damage tolerance. In collaboration with Aidan Doherty (GSDC, Univ Sussex, UK) we have completed the characterization of *Mycobacterium tuberculosis* PolDom, involved in the NHEJ pathway, whose mechanism was shown to be convergent with that of Pol λ and Pol μ . 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. In collaboration with Antonio Bernad (CNB, Madrid), Pol μ was shown to have an impact in genome instability and aging.

Finally, we have characterized a novel primase/polymerase (PrimPol) in human cells, and shown its involvement in damage tolerance and maintenance during replication of both nuclear and mitochondrial DNA, being able to reprime forks stalled as a consequence of replicative stress. These studies, initiated in collaboration with Ian Holt (MRC, UK), and Juan Méndez (CNIO, Spain), will be continued with the analysis of a mouse model of PrimPol deficiency (KO) which is viable, paying special attention at mitochondrial-dependent phenotypes, and at its value as a model for aging and tumorigenesis.

Publicaciones / Publications

Sastre-Moreno, G., Sánchez, A., Esteban, V. and Blanco L. (2014) ATP insertion opposite 8-oxo-deoxyguanosine by Pol4 mediates error-free tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **42**, 9821-9237.

Martin, M.J. and Blanco, L. (2014) Decision-making during NHEJ: a network of interactions in human Pol μ implicated in substrate recognition and end-bridging. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7923-7934.

Garrido, P., Mejía, E., García-Díaz, M., Blanco, L. and Picher, A.J. (2014) The active site of TthPolX is adapted to prevent 8-oxo-dGTP misincorporation. *Nucleic Acids Res.* **42**, 534-543.

Martin, M.J. and Blanco, L. (2013). Evolving DNA repair polymerases: from double-strand break repair to base excision repair and VDJ recombination. In "DNA Repair - New Research Directions", InTech., ISBN 980-953-307-746-3.

Mourón, S., Rodríguez-Acebes, S., Martínez-Jiménez, M.I., García-Gómez, S., Chocrón, S., Blanco, L. and Méndez, J. (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1383-1389.

García-Gómez, S., Aurelio Reyes, A., Martínez-Jiménez, M.I., Sandra Chocrón, E., Mourón, S., Terrados, G., Powell, C., Salido, E., Méndez, J., Holt, I.J. and Blanco, L. (2013) PrimPol, an archaic primase-polymerase operating in human cells. *Molecular Cell*, **52**, 541-553.

Brissett, N.C., Martin, M.J., Bartlett, E.J., Bianchi, J., Blanco, L. and Doherty, A.J. (2013) Molecular Basis for DNA Double-Strand Break Annealing and Primer Extension by an NHEJ DNA Polymerase. *Cell Reports* **5**, 1108-1120.

Martin, M.J., García-Ortiz, M.V., Gomez-Bedoya, A., Esteban, V., Guerra, S. and Blanco, L. (2013) A specific N-terminal extension of the 8 kDa domain is required for DNA end-bridging by human Pol μ and Pol λ . *Nucleic Acids Res.* **41**, 9105-9116.

Esteban, V., Martin, M.J. and Blanco, L. (2013) The BRCT domain and the specific loop 1 of human Pol μ are targets of Cdk2/cyclin A phosphorylation. *DNA Repair (Amst.)* **12**, 824-834.

Ruiz, J.F., Pardo, B., Sastre-Moreno, G., Aguilera, A. and Blanco, L. (2013) Yeast pol4 promotes tel1-regulated chromosomal translocations. *PLoS Genet.* **9**(7):e1003656. PMID: 23874240.

Martin, M.J., García-Ortiz, M.V., Esteban, V. and Blanco, L. (2013) Ribonucleotides and manganese ions improve non-homologous end joining by human Pol μ . *Nucleic Acids Res.* **41**, 2428-2436.

Lucas, D., Delgado-García, J.M., Escudero, B., Albo, C., Aza, A., Acín-Pérez, R., Torres, Y., Moreno, P., Enríquez, J.A., Samper, E., Blanco, L., Fairén, A., Bernad, A. and Gruart, A. (2013) Increased learning and brain long-term potentiation in aged mice lacking DNA polymerase μ . *PLoS One*. **8**(1):e53243. PMID: 23301049.

Aza, A., Martin, M.J., Juarez, R., Blanco, L. and Terrados, G. (2013) DNA expansions generated by human Pol μ on iterative sequences. *Nucleic Acids Research* **41**, 253-263.

Patentes / Patents

Inventores: A.Picher y L. Blanco. Título: Methods for amplification and sequencing using thermostable TthPrimPol. Número de Prioridad: EP13159629. País de prioridad: Europa. Fechas de prioridad: 15 Marzo 2013. Propiedad: Sygnis Biotech S.L.U.

Otras actividades / Other activities

Organizador del Cantoblanco Workshop: "Polymerases involved in DNA replication, repair and mutagenesis", celebrado en el CBMSO (Madrid), en Junio de 2012.

Premio de la Fundación madri+d a la Mejor Patente: "Quimera de la ADN polimerasa del fago phi29".

Premio a la mejor Tesis Doctoral del CBMSO 2012/13, a Sara García-Gómez.

Premio Carmen y Severo Ochoa de investigación en Biología Molecular 2014, a Luis Blanco.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Ana Aza Montoya (2014). *In vivo* role of DNA polymerases lambda and mu in Genome Stability. 2014. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Luis Blanco Dávila y Gloria Terrados Aguado.

Ana Gómez Bedoya (2013). Análisis estructura-función de la DNA polimerasa lambda humana y su implicación en la reparación del DNA mediante NHEJ. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Luis Blanco Dávila.

Sara García Gómez (2013). PrimPol, una nueva primasa/polimerasa en células humanas. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Luis Blanco Dávila y María Isabel Martínez Jiménez.

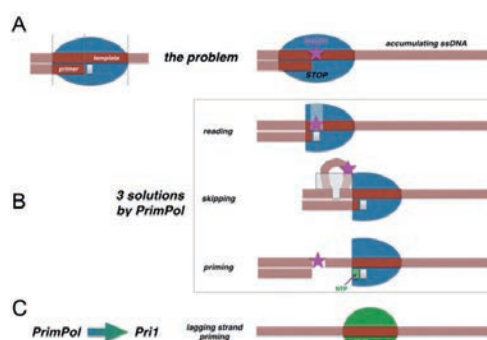


Figura 2. Soluciones alternativas de la PrimPol humana para tolerar lesiones. (A) La replicación se detiene/frena al encontrar una lesión en el molde, acumulándose ssDNA de cadena sencilla por delante de la lesión. (B) PrimPol resuelve el problema de tres maneras: 1) por lectura directa de lesiones, como 8oxoG; 2) esquivando lesiones ilegibles (sitios abásicos, 6-4PP...) mediante realineamiento del primer por delante de la lesión; 3) síntesis de un nuevo primer ahead of the lesion, as a TLS primase. (C) PrimPol puede ser considerada el arquetipo de las primasas convencionales, especializadas en sintetizar primers de RNA exclusivamente.

Figure 2. Alternative solutions for translesion DNA synthesis by human PrimPol. (A) DNA replication is stalled when the replicative DNA polymerase encounters a lesion in the template DNA, accumulating ssDNA ahead of the lesion. (B) PrimPol is able to resolve this problem by 3 different mechanisms: 1) directly reading lesions as 8oxoG, acting as a conventional TLS polymerase; 2) skipping unreadable lesions (abasic sites, 6-4PP...) by microhomology-mediated primer realignment ahead of the lesion; 3) synthesizing a new primer ahead of the lesion, as a TLS primase. (C) PrimPol can be considered the archetype of more conventional primases operating in the lagging strand, that are specialized in making RNA primers exclusively.

Bases moleculares de la citopatología viral y fúngica

Molecular bases of viral and fungal citopathology



Jefe de Línea/Group Leader: Manuel García Moreno
Luis Carrasco Llamas Esther González Almela

Personal Científico / Scientific Staff: Técnicos de Investigación /
Miguel Angel Sanz Fernández Technical Assistance:
(Titulado técnico superior) Carmen Hermoso Crispín
Diana Pisa García

Contratado Postdoctoral / Postdoctoral Fellow:
Enrique Álvarez Gómez

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Ruth Alonso Valledor
Pablo Moral López
Natalia Redondo Sevillano

Resumen de investigación

Se han analizado los mecanismos que regulan la traducción de mRNAs virales y celulares, así como los efectos citopatógenicos de proteínas virales individuales sobre las células de mamífero. En el pasado reciente, nos hemos centrado en el estudio de dos grupos de proteínas citopatógenicas virales: proteasas y viroporinas. Además, hemos dedicado parte de nuestros esfuerzos a elucidar la presencia de infecciones fúngicas como posibles causantes de diversas enfermedades neurodegenerativas de etiología desconocida, tales como la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer.

Regulación de la traducción de mRNAs celulares y virales. Se ha estudiado el efecto de proteasas virales sobre la traducción de diversos mRNAs, así como sobre la redistribución de proteínas celulares entre el núcleo y el citoplasma. Notablemente, las proteasas 2A y L de picornavirus son capaces de dar independencia del factor eIF2 para la traducción de los mRNAs virales.

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 (Figura 1). 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.

Enfermedades neurodegenerativas. Se han desarrollado varios ensayos para detectar la presencia de infecciones fúngicas, tanto en sangre periférica como en líquido cefalorraquídeo ó en muestras de cerebro de pacientes diagnosticados con esclerosis múltiple ó enfermedad de Alzheimer (Figura 2). Se han detectado niveles elevados de macromoléculas fúngicas, tales como polisacáridos, proteínas y DNA en estas muestras. Estos resultados abren una nueva vía de investigación sobre la etiología de estas enfermedades.

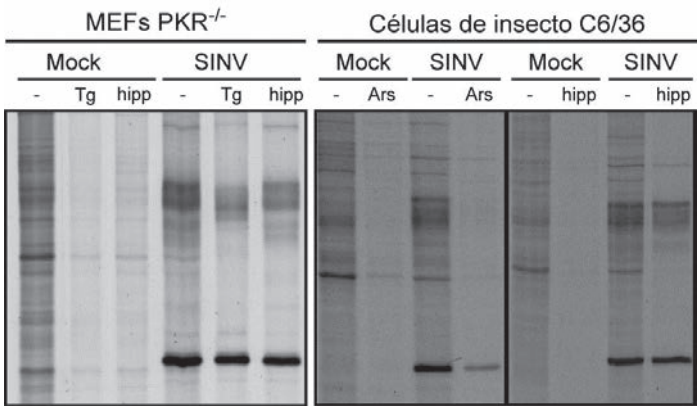


Figura 1. Efecto de inhibidores de los factores de iniciación eIF2, tapsigargina (Tg) ó arsenito sódico (Ars) y del eIF4A, hipuristanol (hipp) sobre la síntesis de proteínas celulares y del virus Sindbis en células de ratón y en células de insecto.

Figure 1. Effect of inhibitors of translation initiation factors eIF2, tapsigargin (Tg) or sodium arsenite (Ars) and eIF4A, hippuristanol (hipp) on protein synthesis from mock-infected cells and from cells infected with Sindbis virus in mouse or insect cells.

Research summary

The mechanisms that regulate translation of cellular and viral mRNAs have been analysed, as well as the cytopathogenic effects of individual viral proteins on mammalian cells. In recent past, we focussed our interest in two types of viral proteins: proteases and viroporins. In addition, we have devoted some efforts to elucidate the presence of fungal infections as the potential etiology of several neurodegenerative diseases, including multiple sclerosis and Alzheimer's disease.

Translational regulation of cellular and viral mRNAs. The action of viral proteases on the translation of different mRNAs has been analysed. We have also studied the redistribution of cellular proteins between the nucleus and the cytoplasm. Notably, the picornavirus 2Apro and Lpro are able to provide eIF2 independence for the translation of viral mRNAs.

Some viral mRNAs can be translated by a dual mechanism and require different initiation factors depending on the translation context. In this regard, Sindbis virus constitutes a good model system for these studies. Translation of the subgenomic mRNA from this virus does not require several initiation factors, such as eIF4A in the infected cells (Figure 1). However, eIF4A is necessary for translation for this mRNA in *in vitro* systems. At present, several constructs bearing different structures in the subgenomic mRNA have been obtained, in order to determine the precise mechanism of its initiation.

Neurodegenerative diseases. A number of assays have been developed to detect the presence of fungal infections in peripheral blood, cerebrospinal fluid and brain samples from patients diagnosed with multiple sclerosis or Alzheimer's disease (Figure 2). Elevated levels of fungal macromolecules have been detected, such as polysaccharides, proteins and DNA. These findings open a new field of research on the etiology of these neurodegenerative diseases.

Publicaciones / Publications

García-Moreno, M., Sanz, M.A., Pelletier, J. and Carrasco, L. (2013). Requirements for eIF4A and eIF2 during translation of Sindbis virus subgenomic mRNA in vertebrate and invertebrate host cells. *Cellular Microbiology* **15**(5): 823-840.

Sanz, M.A., Redondo, N., García-Moreno, M. and Carrasco, L. (2013). Phosphorylation of eIF2 α is responsible for the failure of the picornavirus internal ribosome entry site to direct translation from Sindbis virus replicons. *J. Gen. Virol.* **94**(Pt 4): 796-806.

Linero, F., Welnowska, E., Carrasco, L. and Scolaro, L. (2013). Participation of eIF4F complex in Junin virus infection: blockage of eIF4E does not impair virus replication. *Cellular Microbiology* **15**(10): 1766-1782.

Pisa, D., Alonso, R., Jiménez-Jiménez, F.J. and Carrasco, L. (2013). Fungal infection in cerebrospinal fluid from some patients with multiple sclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **32**(6): 795-801.

Redondo, N., Garcia Moreno, M., Sanz, M.A. and Carrasco, L. (2013). Translation of viral mRNAs that do not require eIF4E is blocked by the inhibitor 4EGI-1. *Virology* **444**(1-2) 171-180.

Alvarez, E., Castelló, A., Carrasco, L. and Izquierdo, J.M. (2013). Poliovirus 2A protease triggers a selective nucleo-cytoplasmic redistribution of splicing factors that regulates alternative pre-mRNA splicing. *PLoS ONE* **16**;8(9): e73723.

Alonso, R., Pisa, D., Rábano, A. and Carrasco, L. (2014). Alzheimer's disease and disseminated mycoses. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**(7): 1125-1132.

Moral-López, P., Alvarez, E., Redondo, N., Skern, T. and Carrasco, L. (2014). L-protease from foot and mouth disease virus confers eIF2-independent translation for mRNAs bearing picornavirus IRES. *FEBS Lett.* **588**(21): 4053-4059.

Alonso, R., Pisa, D., Marina, A.I., Morato, E., Rábano, A. and Carrasco, L. (2014). Fungal infection in patients with Alzheimer's disease. *J. Alz. Dis.* **41**(1): 301-311.

Sanz, M.A., García-Moreno, M. and Carrasco, L. (2014). Inhibition of host protein synthesis by Sindbis virus: correlation with viral RNA replication and release of nuclear proteins to the cytoplasm. *Cell Microbiol. Oct.*

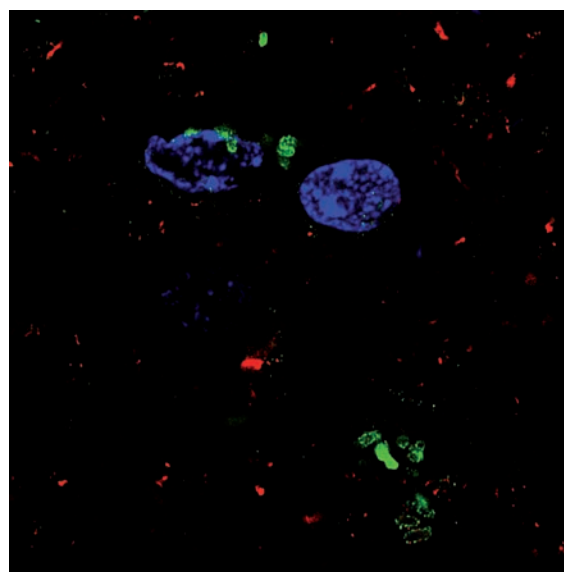


Figura 2. Análisis inmunohistoquímico de células fúngicas en el cortex frontal de un paciente con enfermedad de Alzheimer. Aparece el núcleo teñido con DAPI (azul), las células fúngicas (verde) y neurofilamentos (rojo).

Figure 2. Immunohistochemistry analysis of fungal infection in human frontal cortex from an Alzheimer's disease patient. DAPI staining (blue), fungal cells (green) and neurofilaments (red).

Regulación post-transcripcional de la expresión génica en eucariotas

Post-transcriptional regulation of gene expression in eukaryotes

Jefe de Línea / *Group Leader:* Alejandro Arandilla Alcón
César de Haro Castella (Desde Octubre 2014)

Personal Científico / *Scientific Staff:* Juan José Berlanga Chiquero
Miguel Ángel Rodríguez Gabriel

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:* Javier del Pino García (Hasta Febrero 2014)
Marina Portantier (Hasta Octubre 2013)

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance:* José Alcalde García

Estudiantes / *Undergraduate Students:* Nazareth Aparicio Antón
Almudena Rosa del Río Martín
Rodrigo Fraile Beneitez

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. Nuestro interés se ha centrado en estas líneas:

1) Las eIF2 α quinasas modulan el ciclo celular y la diferenciación sexual en *Schizosaccharomyces pombe*. Los tres miembros de la familia responden de forma diferencial al estrés producido por escasez de nutrientes, siendo la fosforilación del factor eIF2 α esencial para la correcta parada del ciclo celular en la fase G1 y para el apareamiento de las células en ausencia de nitrógeno, promoviendo su supervivencia.

2) Ccr4-Not es un complejo que coordina diferentes aspectos de la regulación de la expresión génica, desde la síntesis de ARNm a su degradación. Hemos estudiado la relación de varias proteínas del complejo Ccr4-Not con los sistemas de respuesta a estrés en *Schizosaccharomyces pombe*. A través de la interacción proteína-proteína y la relación genética hemos intentado desentrañar los vínculos entre las rutas de MAPKs activadas por stress y el complejo Ccr4-Not.

Recientemente, nuestro grupo y el del Dr. Iván Ventoso se han fusionado para desarrollar mejor nuestros objetivos consistentes en: i) estudiar la forma en que las células detectan distintas formas de estrés (radiación ultravioleta, escasez de nutrientes), y responden, a través de la actividad de las eIF2 α quinasas; ii) descripción exhaustiva de la reprogramación traduccional en respuesta a estrés utilizando como sistemas modelo el ratón y la levadura de fisión *S. pombe*; iii) identificación de secuencias y estructuras de los mRNAs, así como de factores proteicos, implicados en dicha reprogramación de la expresión génica; iv) estudiar las implicaciones de estos procesos en la longevidad y en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (cáncer).

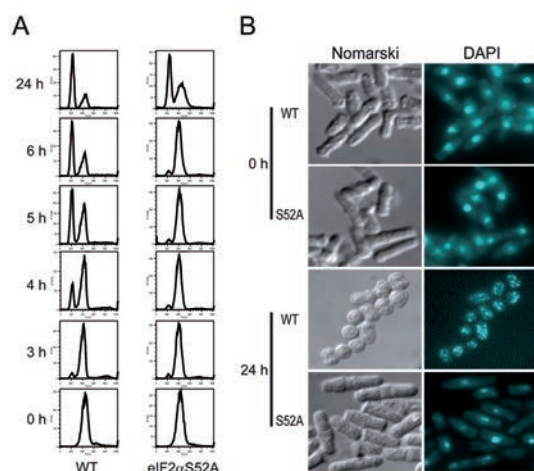


Figura 1. En *S. pombe* la fosforilación de eIF2 α es necesaria para una correcta parada del ciclo celular en la fase G1 en situaciones de ausencia de nitrógeno. (A) Mediante citometría de flujo, se observa que en ausencia de nitrógeno las células eIF2 α S52A, que expresan un eIF2 α no fosforilable, 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 1. 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.

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. Our recent work has been focused on these major lines:

1) Regulation of cell cycle and sexual differentiation by eIF2 α kinases in *Schizosaccharomyces pombe*. There is a differential response of the three members of this kinase family to nutrient deprivation-mediated stress, being phosphorylation of eIF2 α essential for the proper G1-phase cell cycle arrest and for the cell mating in the absence of nitrogen, leading to their survival.

2) Ccr4-Not complex is a coordinator of different aspects of gene expression regulation, from mRNA synthesis to degradation. We have studied the relationship of several Ccr4-Not complex proteins with stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. Through protein-protein interaction and genetic relationship we have unravel the mechanistic links between stress-activated MAPKs and Ccr4-Not complex.

Recently, our group and Dr Iván Ventoso group have joined together in order to better develop our objectives: i) to study the mechanisms by which cells detect and respond to distinct stress forms (ultraviolet radiation, nutrient deprivation) through the activity of eIF2 α kinases; ii) exhaustive description of the translational reprogramming in response to stress, by using mouse and fission yeast *S. pombe* as models; iii) identification of mRNA sequences and structures, together with protein factors, involved in the above mentioned reprogramming of gene expression; iv) to study the implications of these processes in longevity and in the development of age-related diseases (cancer).

Publicaciones / Publications

Martín, R., Berlanga, J.J. and de Haro, C. (2013) New roles of the fission yeast eIF2 α kinases Hri1 and GCN2 in response to nutritional stress. *J. Cell Sci.* **126**, 3010-3020.

Matia-González, A.M., Hasan, A., Moe, G.H., Mata, J. and Rodríguez-Gabriel, M.A. (2013) Functional characterization of Upf1 targets in *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA Biol.* **10**, 1057-1065.

Fernández-Vázquez, J., Vargas-Pérez, I., Sansó, M., Buhne, K., Carmona, M., Hermand, D., Rodríguez-Gabriel, M.A., Ayté, J., Leidel, S. and Hidalgo, E. (2013) Modification of tRNA(Lys) UUU by elongator is essential for efficient translation of stress mRNAs. *PLoS Genet.* **9**, e1003647.

García-Santamarina, S., Boronat, S., Calvo, I.A., Rodríguez-Gabriel, M.A., Ayté, J., Molina, H. and Hidalgo, E. (2013) Is oxidized thioredoxin a major trigger for cysteine oxidation? Clues from a redox proteomics approach. *Antioxid Redox Signal.* **18**, 1549-1556.

Jiménez-Díaz, A., Remacha, M., Ballesta, J.P.G. and Berlanga, J.J. (2013) Phosphorylation of initiation factor eIF2 in response to stress conditions is mediated by acidic ribosomal P1/P2 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **8**, e84219.

Rodríguez-Gabriel, M.A. (2014) Analyzing Cdc2/Cdk1 activation during stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Mol. Biol.* **1170**, 383-392.

Otras actividades / Other activities

Organización de actividades I + D.

Symposium on "Found in translation: Exploring the role of protein synthesis in stress and disease". Fundación Ramón Areces, Madrid. Junio 2014.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Marina Portantier (2013). Papel del complejo Ccr4-Not en la respuesta a estrés mediada por la MAPK Spc1 en *Schizosaccharomyces pombe*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Miguel Ángel Rodríguez Gabriel.

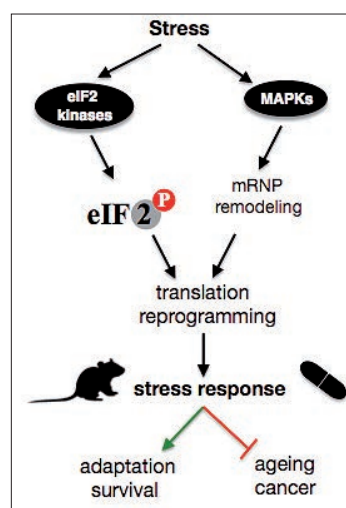


Figura 2. Esquema de la reprogramación traduccional en respuesta a estrés utilizando como sistemas modelo el ratón y la levadura de fisión *S. pombe*.

Figure 2. Scheme of translation reprogramming during stress response in mouse and fission yeast.

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
Isabel Revuelta García

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
Nicoló Baldi
Daniel Gómez Gómez
Gonzalo Herranz Gómez

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Kenza Aghedar
Marcia Ajenjo Pastrana

Resumen de investigación

El interés general de nuestro laboratorio es descifrar la información regulatoria del genoma de los mamíferos y, en concreto, tratar de entender cómo las células coordinan la iniciación de la replicación y de la transcripción para responder a cambios ambientales o a determinantes de identidad celular. Para ello combinamos aproximaciones genómicas dirigidas a caracterizar a gran escala los sitios de inicio de la replicación, la estructura de la cromatina y sus modificaciones epigenéticas con aproximaciones de biología molecular de alta resolución en regiones específicas. Utilizamos como sistemas modelo células humanas y de ratón, tanto silvestres como mutantes en varios de los componentes de la cromatina.

A lo largo de los últimos años se han publicado varios mapas de la localización genómica de los orígenes de replicación en células de mamíferos. Estos estudios han demostrado que, aunque la síntesis de DNA puede empezar en multitud de regiones distintas, aquellas que co-localizan con los promotores de los genes son los orígenes de replicación más eficientes y conservados entre los distintos tipos celulares. En nuestro trabajo reciente hemos encontrado que en estos orígenes eficientes la replicación se inicia en regiones de alta ocupación nucleosomal. Por el contrario, los sitios a los que se une el Complejo de Reconocimiento de los Orígenes (ORC) se encuentran inmediatamente adyacentes y colocalizan con sitios de posicionamiento de nucleosomas lábiles. A partir de estos resultados nuestra hipótesis de trabajo es que la arquitectura nucleosomal en los orígenes de replicación dicta los sitios de síntesis de la cadena leading del DNA. La reposición de estos nucleosomas específicos en las cadenas hijas proveería de la oportunidad para cambiar la estructura de la cromatina de estas regiones promoviendo así los cambios que se producen durante la diferenciación celular y el desarrollo.

Nuestros estudios están enfocados a dilucidar el mecanismo que acopla la transmisión de la información genética y epigenética de las regiones reguladoras que controlan la iniciación de la replicación y de la transcripción. Este conocimiento contribuirá a una mejor comprensión del complejo papel regulador de la cromatina en la estabilidad y versatilidad del genoma. Además, el entender las interacciones moleculares entre el complejo ORC y los nucleosomas tiene implicaciones para interferir con este tipo de unión entre ORC y los orígenes de replicación y controlar así la división celular.

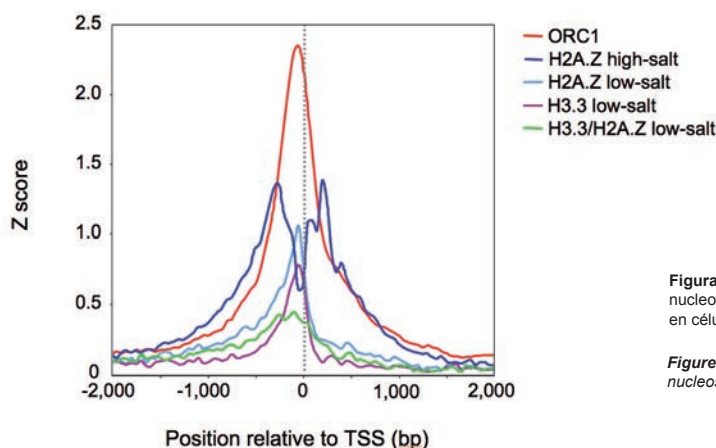


Figura 1. Distribución de los sitios de unión de ORC y de nucleosomas lábiles en orígenes de replicación eficientes en células humanas.

Figure 1. Distribution of ORC binding sites and labile nucleosomes at efficient replication origins in human cells.

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 and their epigenetic requirements, with genome-wide approaches aimed to reveal the complexity of the organization of both basic genomic processes. As model systems we use human and mouse cells, both wild-type and mutant for several key chromatin components and regulators.

During the last years several efforts to map replication origins genome-wide in mammalian cells revealed that, although DNA synthesis can start at multiple genomic sites, those co-localizing with gene promoters are more efficiently activated and more conserved across cell types. We have recently demonstrated that replication initiation sites at these efficient promoter-origins occur at positions of high nucleosome occupancy. The binding sites for the Origin Recognition Complex (ORC), however, occur at adjacent but distinct positions marked by labile nucleosomes. Derived from these studies, our working hypothesis is that nucleosome architecture at replication origins dictates the start sites of leading strand synthesis and that the reposition of these specific nucleosomes behind the replication fork could provide the opportunity to change the chromatin structure that could promote a switch during cell differentiation and development. Our studies aim to provide fundamentally new and important insight into the mechanisms by which transmitting genetic and epigenetic information of the regulatory regions that control replication and transcription initiation sites are coupled. This knowledge will likely contribute to a better understanding of the complex role of chromatin in regulating the genome versatility and stability. In addition, understanding the molecular interactions between ORC and nucleosomes might have implications for interfering with this type of ORC-origin binding to control cell division.

Publicaciones / Publications

Lombraña, R., Almeida, R., Revuelta, I., Madeira, S., Herranz, G., Saiz, N., Bastolla, U. and Gómez, M. (2013). High-resolution analysis of DNA synthesis start sites and nucleosome architecture at efficient mammalian replication origins. *EMBO J* **32**: 2631-2644.

Ayuda-Durán, P., Devesa, F., Gomes, F., Sequeira-Mendes, J., Avila-Zarza, C., Gómez, M. and Calzada A. (2014) The CDK regulators Chd1 and Sic1 promote efficient usage of DNA replication origins to prevent chromosomal instability at a chromosome arm. *Nucl. Acids Res.* **42**: 7057-7068.

Otras actividades / Other activities

Co-organizadora científica de los encuentros bianuales del Madrid Chromatin Club, CBMSO.

Scientific co-organizer of the biannual Madrid Chromatin Club Meetings, CBMSO.

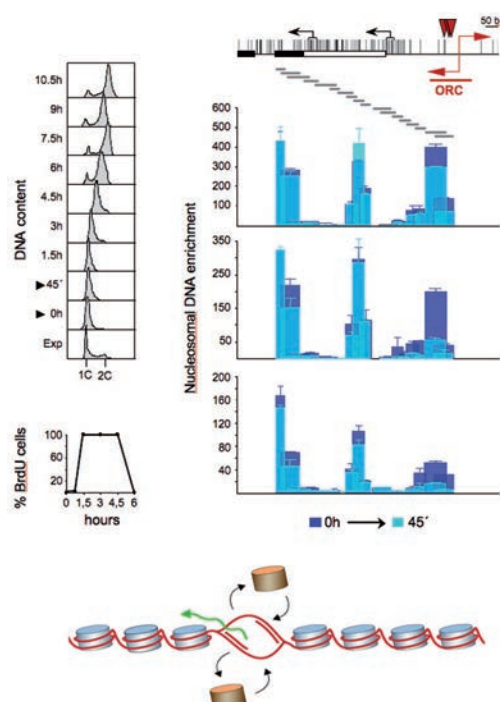


Figura 2. Dinámica de nucleosomas durante la activación del origen de replicación humano LaminB2 al principio de la fase S del ciclo celular.

Figure 2. Nucleosome dynamics at the human replication origin LaminB2 upon S-phase entry.

División celular, replicación del genoma y cromatina

Cell division, genome replication and chromatin



Jefe de Línea / Group Leader: Crisanto Gutiérrez

Técnico de Investigación / Technical Assistance: Victoria Mora-Gil Cobo

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows: Bénédicte Desvoves, Joana Sequeira-Mendes, María Fernández Marcos, Elena Caro Bernat, Irene Aragüez Rey

Estudiantes / Undergraduate Students: Alexandra Martín, María Delgado, David Schlager

Becarios Predoctorales / Graduate Students: Sofía Otero Pérez, Zaida Vergara Pardillo, Carla Mendez Losi, Ana Sofia Madeira, Nuria Mauri Panadero

Científicos Visitantes / Visiting Scientists: Adriana Garay, Martina Dvorackova

Resumen de investigación

La transición a la multicelularidad requirió el desarrollo de nuevas estructuras y mecanismos para coordinar la división celular, la adquisición de identidades y la diferenciación en complejas redes regulatorias. Nuestro grupo está interesado en entender los mecanismos que controlan estos procesos y cómo la epigenética afecta a dicha coordinación.

Para ello, usamos la planta *Arabidopsis thaliana* que nos permite realizar abordajes moleculares, celulares, genéticos y genómicos. Además, el desarrollo en plantas, al contrario que en animales, es postembrionario y continuo durante toda la vida. Así, nuestra investigación está encaminada a responder cuestiones fundamentales sobre control de la proliferación celular, la homeostasis celular y la replicación del genoma de organismos multicelulares y su regulación a nivel de organismo.

La proliferación celular es fundamental para la organogenesis que a su vez está determinada por un estricto control de la expresión génica.

Estudiamos la dinámica de la cromatina a lo largo del ciclo celular con especial énfasis en dos aspectos: uno, la regulación del potencial de proliferación, muy relacionado con el control de la expresión génica en G1 y en G2, y la salida a diferenciación, y otro, relacionado con la duplicación del genoma.

La duplicación del genoma implica que no solo el DNA sino la cromatina tiene que ser duplicada en cada ciclo celular. A su vez, varias etapas de la replicación están asociadas a estados específicos de la cromatina. Hemos identificado 9 estados de cromatina que definen el genoma de *Arabidopsis* en virtud de combinaciones de marcas epigenéticas. Estamos desarrollando metodologías genómicas para estudiar los orígenes de replicación en todos los tipos celulares de un organismo completo para determinar la influencia de las condiciones hormonales, las señales de desarrollo y el ambiente en su actividad. Este abordaje nos permite el uso de mutantes para el estudio de la replicación del genoma.

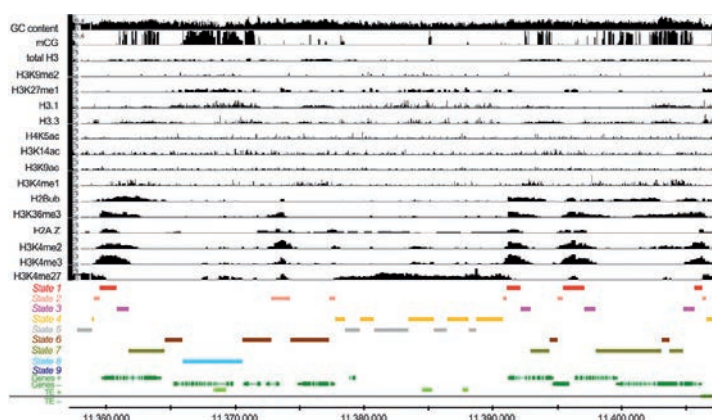


Figura 1. El genoma de *Arabidopsis* (Chr 1) en 9 estados de cromatina (coloreados).

Figure 1. The *Arabidopsis* genome (Chr 1) in 9 color-coded chromatin states.

Research summary

The transition to multicellularity required the evolution of novel structures and mechanisms to coordinate cell division, acquisition of cell fates and the differentiation and establishment of complex regulatory networks. Our group is interested in understanding the mechanisms that control these processes and how epigenetic mechanisms affect such coordination.

To that end, we use the model plant *Arabidopsis thaliana* that offer us the possibility of carrying out molecular, cellular, genetic and genomic approaches. In addition, plant development, contrary to the situation in animals, is post-embryonic and occurs during the entire life of the organism. Our research is aimed at understanding fundamental questions on cell proliferation control, cellular homeostasis and genome replication in multicellular organisms.

Cell proliferation is crucial for organogenesis, which is determined by a strict control of gene expression patterns.

We study chromatin dynamics along the cell cycle with special emphasis in two aspects: one, the regulation of cell proliferation potential, very related to the control of gene expression in G1 and G2, and the exit to differentiation, and another, related to genome replication.

This implies that not only DNA but chromatin needs to be duplicated every cell cycle. In turn, several stages of genome replication are associated with specific chromatin states. We have identified 9 distinct chromatin states that define the *Arabidopsis* genome based on specific combinations of epigenetic marks (signatures). We are also developing genomic strategies to study the functional properties of replication origins in all cell types of the whole organism to determine the influence of hormonal conditions, developmental signals and the environment. This approach is allowing us to use mutants to study genome replication.

Publicaciones / Publications

Lario, L., Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C., Spampinato, C., Casati, P. (2013) ANTI-SILENCING FUNCTION1 proteins are involved in ultra-violet-induced DNA damage repair and are cell cycle regulated by E2F transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **162**, 1164-1177.

Triviño, M., Martín-Trillo, M., Ballesteros I., Delgado D., de Marcos, A., Desvoves, B., Gutierrez, C., Mena, M., Fenoll, C. (2013) Timely expression of *Arabidopsis* stoma-fate master regulator MUTE is required for specification of other epidermal cell types. *Plant J.* **75**, 808-822.

Gutierrez, C., Sequeira-Mendes, J., Aragüez, I. (2013) Replication of Plant genomes. En: *The Plant Sciences: Molecular Biology*. M. Tester, R. A. Jorgensen, Eds. Article ID: 349832. Springer.

Desvoves, B., de Mendoza, A., Ruiz-Trillo, I., Gutierrez, C. (2014) Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division. *J. Exp. Bot.* **65**, 2657-2666.

Edgar, B.A., Zielke, N., Gutierrez, C. (2014) Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nature Rev Cell Mol. Biol.* **15**, 197-210.

Hénaff, E., Vives, C., Desvoves, B., Chaurasia, A., Payet, J., Gutierrez, C., Casacuberta, JM. (2014) Extensive amplification of the E2F transcription factor binding sites by transposons during evolution of Brassica species. *Plant J.* **77**, 852-862.

Otero, S., Desvoves, B., Gutierrez, C. (2014) Histone H3 dynamics in plant cell cycle and development. *Cytogenet. Genomic Res.* **143**, 114-124.

Coego, A., Brizuela, E., Castillejo, P., Ruiz, S., Koncz, C., del Pozo, J.C., Piñeiro, M., Jarillo, J.A., Paz-Ares, J., Leon J., and the TRANSPLANTA Consortium. (2014) The TRANSPLANTA Collection of *Arabidopsis* Lines: A resource for Functional Analysis of Transcription Factors based on their conditional Overexpression. *Plant J.* **77**, 944-953.

Sequeira-Mendes, J., Aragüez, I., Peiró, R., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Bastolla, U., Gutierrez, C. (2014) The Functional Topography of the *Arabidopsis* Genome is organized in a reduced Number of linear Motifs of Chromatin states. *Plant Cell* **26**, 2351-2366.

Desvoves, D., Fernandez-Marcos, M., Sequeira-Mendes, J., Otero, S., Vergara, Z., Gutierrez, C. (2014) Looking at plant cell cycle from the chromatin window. *Frontiers Plant Sci.* **5**, 369.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Nuria Mauri Panadero (2013) GEM, una proteína con dominio GRAM, es un regulador negativo de la señalización por ABA durante la germinación en *Arabidopsis thaliana*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Crisanto Gutiérrez.

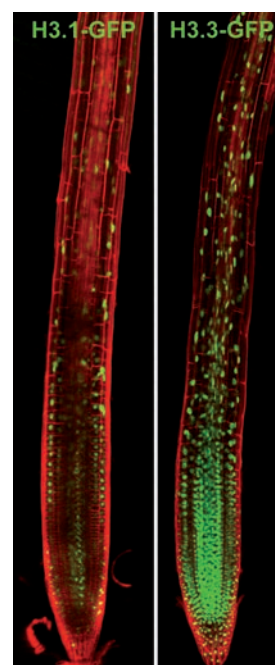


Figura 2. Identificación de las histonas H3.1 y H3.3 en la raíz de *Arabidopsis*.

Figure 2. Identification of histone H3.1 and H3.3 in the *Arabidopsis* root.

Otras actividades / Other activities

Editorial Board de EMBO J., EMBO Rep., Plant J.

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: David Piñeiro, Gloria Lozano, Rosario Francisco, Rosa Diaz-Toledano

Becarios Predoctorales / Graduate Students: Alfonso Galán, Javier Fernández

Técnico de Investigación / Technical Assistance: Jorge Ramajo

Estudiantes / Master Students: Azmane Mohamed Embarek

Científicos Visitantes / Visiting Scientists: Ivan Dotu (Boston College, Biology Dept Courtesy appt. Computer Science Dept., Boston MA USA)

Resumen de investigación

Nuestro grupo está interesado en entender mecanismos alternativos de iniciación de la traducción. Los sitios de entrada interna del ribosoma (IRES) son regiones del mRNA que forman complejos ribonucleoproteicos en los que la estructura del RNA determina tanto su actividad como la interacción con proteínas implicadas en iniciación de la traducción. El estudio reciente de Gemin5, un regulador negativo de la traducción, ha demostrado que interacciona con RNA a través de su extremo C-terminal. La interacción de Gemin5 con el IRES permite flexibilidad de secuencia pero requiere una horquilla rodeada de una secuencia rica en Cs y Us. La interacción de Gemin5 con el IRES desplaza de su sitio de unión a PTB, un estimulador de la iniciación interna explicando su efecto como regulador negativo. El estudio de los dominios de la proteína que interaccionan con el IRES ha revelado la presencia de un motivo de unión a RNA bipartito en el que RBS1 interacciona con RNA con mayor afinidad y RBS2 alberga el motivo regulador de la traducción (Fig 1).

Motivos conservados evolutivamente en el RNA determinan su estructura terciaria. El conocimiento de la estructura de un subdominio conservado y esencial del IRES ha permitido predecir secuencias que pliegan como esta región en secuencias de genomas mediante el algoritmo Inverse Folding. De esta forma determinamos que una parte de la región codificante del factor TAF6 de *Drosophila melanogaster* es capaz de conferir una débil iniciación interna, demostrando que es una herramienta útil para predecir motivos tipo IRES. Recientemente hemos descrito que el plegamiento del elemento IRES depende de la concentración iónica del medio (Fig 2). Mientras que a concentraciones de iones divalentes cercanas a la concentración fisiológica la estructura del IRES es flexible, concentraciones altas constriñen la estructura del IRES e impiden la interacción con eIF4G inactivando su función.

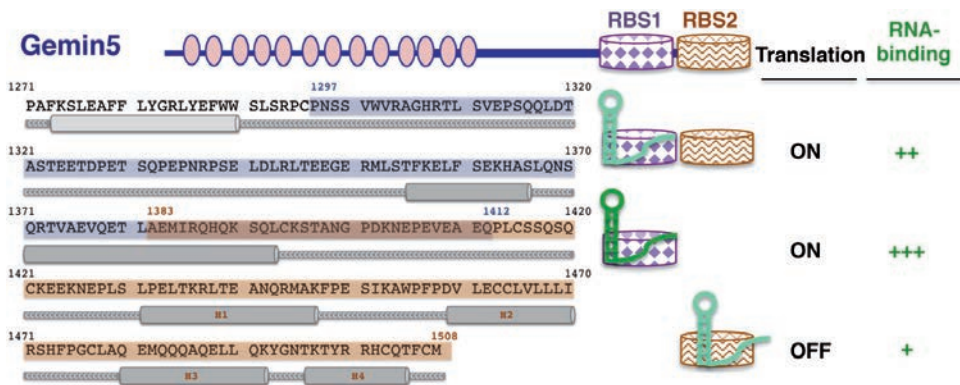


Figura 1. Sitio de interacción con RNA de la proteína Gemin5.

Figure 1. RNA-binding site of Gemin5.

Research summary

Our main goal is to understand alternative mechanisms of translation initiation in eukaryotes. Internal Ribosome Entry Site (IRES) elements are mRNA regions that govern internal initiation of translation. To achieve its function, IRES elements assemble ribonucleoprotein complexes in which RNA structure and IRES function is tightly coupled. During this period we have characterized the function of Gemin5 as a negative regulator of IRES-dependent translation. Gemin5 binds to a discrete IRES stem-loop through its C-terminal region. Binding of Gemin5 allows a large degree of sequence flexibility and requires a short hairpin surrounded by C or U-rich sequences. Interaction of Gemin5 with the IRES competes out the binding of PTB, a protein stimulating IRES activity, explaining at least in part its negative effect on translation initiation. Analysis of the protein domains involved in IRES recognition revealed the presence of a bipartite non-conventional RNA-binding motif, where RBS1 binds RNA with higher affinity and RBS2 harbors the translation control motif (Fig 1).

Evolutionary conserved RNA motifs determine its tertiary structure. Knowledge of the structural organization of a conserved essential subdomain allowed the prediction of genome sequences potentially adopting IRES-like structural motifs. Using Inverse Folding, we have found that a short sequence within the open-reading-frame of *Drosophila melanogaster* TAF6 can confer weak but positive translation initiation, reinforcing the idea that this is a useful tool to predict IRES-like structural motifs. In addition, we have shown recently that IRES folding depends on divalent ions concentration (Fig. 2). This study showed that RNA structure is flexible at concentration of divalent ions close to physiological concentrations and allows its recognition by eIF4G, a factor needed for IRES activity. In contrast, high Mg^{2+} concentration induces a constrained RNA structure, precluding the binding of this factor, and explaining the lack of IRES activity at high salt conditions.

Publicaciones / Publications

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.

Fernandez, N., Buddrus, L., Piñeiro, D. and Martínez-Salas, E. (2013) Evolutionary conserved motifs constrain the RNA structure organization of picornavirus IRES. *FEBS letters*, **587**, 1353-1358.

Martínez-Salas, E., Lozano, G., Fernandez-Camorro, J., Francisco-Velilla, R., Galan, A. and Diaz, R. (2013) RNA-binding proteins impacting on internal initiation of translation. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 21705-21726.

Dotu, I., Lozano, G., Clote, P. and Martínez-Salas, E. (2013) Using RNA inverse folding to identify IRES-like structural motifs. *RNA Biol*, **10**, 1842-1852.

García-Núñez, S., Gismondi, M.I., König, G., Berinstein, A., Taboga, O., Rieder, E., Martínez-Salas, E. and Carrillo, E. (2014) Enhanced IRES activity by the 3'UTR element determines the virulence of FMDV isolates. *Virology*, **448**, 303-313.

Fernandez-Chamorro, J., Piñeiro, D., Gordon, J.M., Ramajo, J., Francisco-Velilla, R., Macias, M.J. and Martínez-Salas, E. (2014) Identification of novel noncanonical RNA-binding sites in Gemin5 involved in internal initiation of translation. *Nucleic Acids Res*, **42**, 5742-5754.

Lozano, G., Fernandez, N. and Martínez-Salas, E. (2014) Magnesium-dependent folding of a picornavirus IRES element modulates RNA conformation and eIF4G interaction *FEBS J*, **281**, 3685-3700.

Sheldon, J., Beach, N.M., Moreno, E., Gallego, I., Piñeiro, D., Martínez-Salas, E., Gregory, J., Quer, J., Esteban, J.I., Rice, C.M., Domingo, E. and Perales, C. (2014) Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus. *J. Virol*, **88**, 12098-12111.

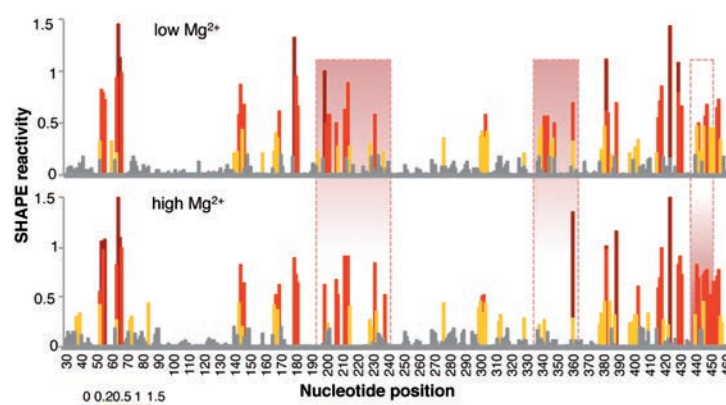
Jimenez-Gonzalez, A.S., Fernandez, N., Martínez-Salas, E., and Sánchez de Jiménez, E. (2014) Functional and structural analysis of maize hsp101 IRES. *PLoS ONE*, **9**(9):e107459.

Otras actividades / Other activities

E Martínez-Salas es miembro del Comité Editorial de Virology / Member of the Editorial Board of Virology.

Figure 2. Analysis estructural del IRES via SHAPE.

Figure 2. IRES structural analysis via SHAPE.



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:

Esther Garde Contreras
Diana Martín Lorenzo

(Hasta diciembre 2013)

César Poza Carrión

(Desde enero 2014)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:

José Carlos Solana Morcillo

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Sandra González de la Fuente

Alba Guillén García

Sara López Pérez

Elena Martínez Blanco

Científicos Visitantes /

Visiting Scientist:

Paola Andrea Nocua Martínez

(Pontificia Universidad Javeriana,

Bogotá, Colombia)

Resumen de investigación

Una de las peculiaridades moleculares más llamativas de *Leishmania* es la ausencia de una regulación transcripcional. En estos organismos la expresión génica es controlada por mecanismos postranscripcionales, por lo que son modelos muy atractivos para estudiar los mecanismos de regulación postranscripcional, sin la interferencia de la regulación transcripcional. Además, estos parásitos unicelulares son patógenos importantes de humanos.

Nuestro interés es contribuir al conocimiento sobre los mecanismos por los que la expresión génica es controlada en *Leishmania*. Nuestro grupo ha venido trabajando en la identificación tanto de elementos reguladores en *cis*, frecuentemente localizados en regions 3' no traducidas (3'-UTRs), como de proteínas de unión a RNA (RBPs), como determinantes clave de la regulación de la expresión génica. Sin embargo, una dificultad importante con la que nos hemos encontrado es la deficiente anotación que presentan las bases de datos del genoma de *Leishmania* en cuanto a la localización de las 5'- y 3'-UTRs. Afortunadamente, los avances en la tecnología de secuenciación están facilitando la definición con gran detalle de los transcriptomas. En colaboración con la Unidad de Genómica y Secuenciación masiva del CBMSO, dirigida por la Dra. Begoña Aguado, hemos definido los transcriptomas de *Leishmania major* y otras especies del género *Leishmania* mediante la secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq). Disponer de esta información es clave para la identificación de los elementos funcionales en los mRNAs y para establecer la regulación temporal de la expresión génica en los diferentes estadios del desarrollo de este parásito.

Por otro lado, dentro de la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (ISCIII; <http://www.ricet.es/es/>), nuestro grupo participa en proyectos colaborativos en los que se están explorando nuevas estrategias terapéuticas y preventivas en el control de las leishmaniasis, un grupo de enfermedades que continúan afectando a millones de personas en todo el mundo. También, nuestro grupo participa en un proyecto de la Comisión Europea (7º programa marco), titulado "Clinical Studies on a Multivalent Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis (MuLeVaClin)", que está dirigido al desarrollo de una vacuna frente a la leishmaniasis visceral en humanos (<http://www.mulevacin.eu>). Asimismo, nuestro grupo participa en un proyecto financiado por la Comunidad de Madrid, que tiene como título "PrimPol: una nueva DNA Primasa/Polimerasa con un posible papel en envejecimiento" (<http://vmbacterio.cbm.uam.es/primpol/Primpol/Inicio.html>)

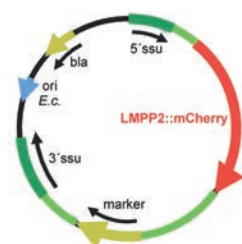
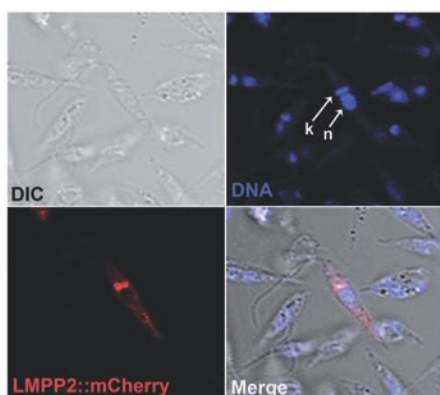


Figura 1. Localización subcelular de la proteína PrimPol en promastigotes de *Leishmania major*. La construcción codificante para la proteína LMPP2::mCherry fue integrada en el genoma del parásito utilizando el vector pLEXSY. k, kinetoplasto; n, núcleo.

Figure 1. Subcellular location of PrimPol in *L. major* promastigotes. The construct coding for LMPP2::mCherry was integrated into the genome by using the vector pLEXSY. k, kinetoplast; n, nucleus.

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.

The main interest of our laboratory is contributing to the knowledge of mechanisms by which gene expression in *Leishmania* is controlled. We are working in the identification of both regulatory cis-elements, often found in the 3' untranslated regions (UTRs) of mRNAs, and RNA-binding proteins (RBPs), as key players in the regulation of gene expression. However, a constraint for these studies was the deficient annotation existing 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, headed by Dr. Begoña Aguado, we have reconstructed 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; <http://www.ricet.es/es/>), 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. Also, we are participating in a project granted by the European Commission's FP7 Cooperation Work Program for Health; this project entitled Clinical Studies on a Multivalent Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis (MuLeVaClin) is aimed to develop a vaccine against human visceral leishmaniasis (<http://www.mulevacclin.eu>). Finally, our group is also participating in a Madrid Community project entitled "PrimPol: una nueva DNA Primasa/ Polimerasa con un posible papel en envejecimiento" (<http://vmbacterio.cbm.uam.es/primpol/Primpol/Inicio.html>).

Publicaciones / Publications

Rastrojo, A., Carrasco-Ramiro, F., Martín, D., Crespillo, A., Reguera, R.M., Aguado, B. and Requena, J.M. (2013). The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. *BMC Genomics* **14**, 223.

Prada, C.F., Alvarez-Velilla, R., Balaña-Fouce, R., Prieto, C., Calvo-Alvarez, E., Escudero-Martínez, J.M., Requena, J.M., Ordoñez, C., Desideri, A., Perez-Pertejo, Y. and Reguera, R. M. (2013). Gimatecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. *Biochem Pharmacol* **85**, 1433-1440.

Fraga, J., Montalvo, A.M., Van der Auwera, G., Maes, I., Dujardin, J.C. and Requena, J.M. (2013). Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infect. Genet. Evol.* **18**, 229-237.

Ramírez, C.A., Requena, J.M. and Puerta, C.J. (2013). Alpha tubulin genes from *Leishmania braziliensis*: genomic organization, gene structure and insights on their expression. *BMC Genomics* **14**, 454.

Ramírez, C.A., Dea-Ayuela, M.A., Gutierrez-Blazquez, M.D., Bolas-Fernandez, F., Requena, J.M. and Puerta, C.J. (2013). Identification of proteins interacting with HSP70 mRNAs in *Leishmania braziliensis*. *J. Proteomics* **94**, 124-137.

Montalvo, A.M., Fraga, J., Rodríguez, O., Blanco, O., Llanos-Cuentas, A., García, A.L., Valencia, B.M., Muskus, C., Van der Auwera, G. and Requena, J.M. (2014). Detección de *Leishmania* spp. en base al gen que codifica la proteína HSP20. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública* **31**, 635-643.

Nocua, P.A., Ramírez, C.A., Barreto, G.E., Gonzalez, J., Requena, J.M. and Puerta, C.J. (2014). *Leishmania braziliensis* replication protein A subunit 1: molecular modelling, protein expression and analysis of its affinity for both DNA and RNA. *Parasites & Vectors* **7**, 573.

Replicación del DNA del bacteriófago ø29

Virus de la peste porcina Africana

Replication of bacteriophage ø29 DNA

African swine fever virus



Jefe de Línea / Group Leader:
Margarita Salas Falgueras

Responsable de Proyecto /
Project Responsible:
María Luisa Salas Falgueras

Personal Científico / Scientific Staff:
Mario Mencía Caballero

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Laura Mojardín Menéndez
Modesto Redrejo Rodríguez
Irene Rodríguez García

Predoctorales /
Predoctoral Students:
David Ballesteros Plaza

(Hasta el 20 de septiembre de 2013)
Marina del Rosal Macías
Pablo Gella Montero

Isabel Holguera López
Alicia del Prado Díaz
M^a Eugenia Santos del Río

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
María José Bustos Sánchez
José M^a Lázaro Bolós
M^a Angeles Martínez Villarraso
Laurentino Villar García

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Daniel González Acosta
Diego Martínez Alonso

Científicos Visitantes/
Visiting Scientists:
Nadine Fornelos
Paula López Monteagudo

Resumen de investigación

Hemos continuado con el estudio de la replicación del DNA de ø29 que se inicia mediante la proteína terminal (TP). Hemos optimizado los orígenes de replicación del DNA de ø29 para la replicación iniciada con TP. La Lys529 de la DNA polimerasa de ø29 está implicada en la estabilización del extremo del "primer" en el sitio activo de polimerización. Dicha lisina y el Glu233 de la TP establecen contactos para la iniciación de la replicación del TP-DNA. El motivo LExE, conservado en DNA polimerasas de tipo eucariótico, está implicado en la interacción con el nucleótido entrante. Los residuos Tyr226 y Tyr390 en el sitio activo de la DNA polimerasa de ø29 están implicados en el mecanismo de translocación y en la unión del dNTP y del pirofosfato. En la TP de ø29, existe una correlación entre la capacidad de unión al DNA y la localización en el nucleóide. Por otra parte, la localización nuclear y en el nucleóide de las TPs de ø29 y otros bacteriófagos son funciones conservadas independientemente. La proteína p1 de ø29 se asocia con el anillo FtsZ del divisoma de *Bacillus subtilis* produciendo un aumento en la longitud celular lo que da lugar a una mayor acumulación del DNA viral. En colaboración con la Dra. Beatriz González hemos obtenido la estructura tridimensional de la uracil-DNA glicosilasa (UDG) de *B. subtilis* sola y en complejo con la proteína p56 de ø29 y hemos determinado aminoácidos críticos para la inhibición de la UDG por p56.

La función de genes virales en la replicación del virus de la peste porcina africana está siendo investigada mediante la generación de virus recombinantes. Hemos construido un virus recombinante inducible en el gen R298L que codifica por una proteína quinasa (PK) viral, demostrando que en condiciones de represión el virus no sale de la célula, aunque se produce virus intracelular infectivo. El virus es capaz de salir de la factoría viral citoplasmática pero queda retenido en la membrana plasmática.

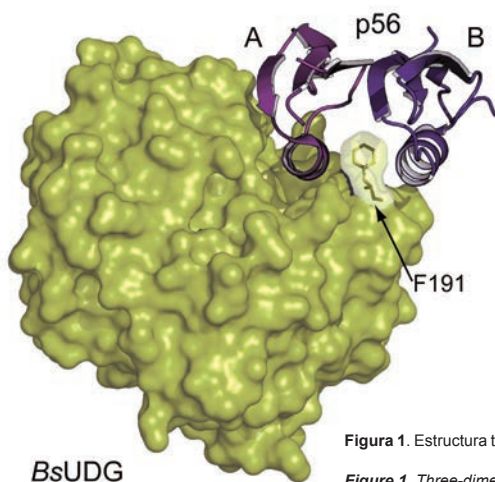


Figura 1. Estructura tridimensional del complejo UDG-p56.

Figure 1. Three-dimensional structure of the UDG-p56 complex.

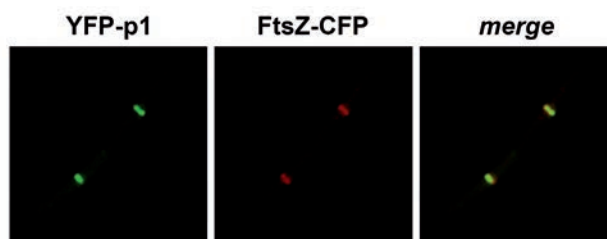


Figura 2. Colocalización de la proteína p1 de ø29 y la FtsZ de *B. subtilis*.

Figure 2. Colocalization of ø29 protein p1 and *B. subtilis* protein FtsZ.

Research summary

We have continued with the study of the mechanism of ϕ 29 DNA replication initiated by TP-priming. We have optimized the ϕ 29 replication origins for TP-primed initiation of replication. ϕ 29 DNA polymerase Lys529 is involved in the stabilization of the primer-terminus in the polymerization active site. This lysine and Glu233 of the TP establish contacts for the initiation of TP-DNA replication. The LEXE motif, conserved in eukaryotic-type DNA polymerases, is involved in the interaction with the incoming nucleotide. Residues Tyr226 and Tyr390 in the ϕ 29 DNA polymerase active site are involved in the mechanism of translocation and in dNTP and pyrophosphate binding. In the ϕ 29 TP there is a correlation between the capacity of DNA binding and nucleoid localization. On the other hand, the nuclear and nucleoid localization of the TPs of ϕ 29 and other bacteriophages are independently conserved functions. The ϕ 29 protein p1 associates with the FtsZ ring of the *Bacillus subtilis* divisome producing an increase in the cellular length and in the accumulation of the viral DNA. In collaboration with Dr. Beatriz González we have obtained the three-dimensional structure of the *B. subtilis* uracil-DNA glycosylase (UDG) free and in complex with the ϕ 29 protein p56 and we have determined key amino acids for the UDG inhibition by p56.

The function of African swine fever virus genes in virus replication is being studied by the generation of virus recombinants. We have constructed a virus recombinant inducible in gene R298L coding for a viral protein kinase (PK), showing that under repression conditions the virus does not exit from the cell, although infectious intracellular virus is produced. The virus can exit the cytoplasmic viral factory but remains retained at the plasma membrane.

Publicaciones / Publications

Redrejo-Rodríguez, M., Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Mencía, M. and Salas, M. (2013). Nuclear localization signals in phage terminal proteins provide a novel gene delivery tool in mammalian cells. *Communicative & Integrative Biology* **6**, 22829-1-3

Baños-Sanz, J.I., Mojardín, L., Sanz-Aparicio, J., Lázaro, J.M., Villar, L., Serrano-Heras, G., González, B. and Salas, M. (2013). Crystal structure and functional insights into uracil-DNA glycosylase inhibition by phage ϕ 29 DNA mimic protein p56. *Nucleic Acids Res.* **41**, 6761-6773.

Ballesteros-Plaza, D., Holguera, I., Scheffers, D.J., Salas, M. and Muñoz-Espín, D. (2013). Phage ϕ 29 protein p1 promotes replication by associating with the FtsZ ring of the divisome in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 12313-12318.

Del Prado, A., Lázaro, J.M., Villar, L., Salas, M. and de Vega, M. (2013). Dual role of ϕ 29 DNA polymerase Lys529 in stabilisation of the DNA priming-terminus and the terminal protein-priming residue at the polymerase site. *PLoS One.* **8**, 72765.

Mojardín, L., Botet, J., Quintales, L., Moreno, S. and Salas, M. (2013). New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5'-Fluorouracil in eukaryotic cells. *PLoS One.* **8**, 78172.

Redrejo-Rodríguez, M., Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Mencía, M. and Salas, M. (2013). Nuclear and nucleoid localization are independently conserved functions in bacteriophage terminal proteins. *Mol. Microbiol.* **90**, 858-868.

Salas, M. L. and Andrés, G. (2013) African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.* **173**, 29-41.

Rodríguez, J. M. and Salas, M. L. (2013) African swine fever virus transcription. *Virus Res.* **173**, 15-28.

Redrejo-Rodríguez, M., Rodríguez, J. M., Suárez, C., Salas, J. and Salas, M. L. (2013) Involvement of the reparative DNA polymerase pol X of African swine fever virus in the maintenance of viral genome stability. *J. Virol.* **87**, 9780-9787.

Holguera, I., Redrejo-Rodríguez, M., Salas, M. and Muñoz, D. (2014). New insights in the ϕ 29 terminal protein DNA-binding and host nucleoid localization functions. *Mol. Microbiol.* **91**, 232-241.

Santos, E., Lázaro, J.M., Salas, M. and de Vega, M. (2014). Role of the LEXE motif of protein-primed DNA polymerases in the interaction with the incoming nucleotide. *J. Biol. Chem.* **289**, 2888-2898.

Burenina, O. Y., Hoch, P. G., Damm, K., Salas, M., Zatsepin, T. S., Lechner, M., Oretskaya, T. S., Kubareva, E. A. and Hartmann, R. K. (2014). Mechanistic comparison of *Bacillus subtilis* 6S-1 and 6S-2 RNAs – commonalities and differences. *Nucleic Acids Res.* **20**, 348-359.

Dahl, J. M., Wang, H., Lázaro, J.M., Salas, M. and Lieberman, K.R. (2014). Dynamics of translocation and substrate binding in individual complexes formed with active site mutants of ϕ 29 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **289**, 6350-6361.

Gella, P., Salas, M. and Mencía, M. (2014). Improved artificial origins for phage ϕ 29 terminal protein-primed replication. Insights into early replication events. *Nucleic Acids Res.* **42**, 9792-9806.

Redrejo-Rodríguez, M. and Salas, M. (2014). Multiple roles of genome-attached bacteriophage terminal proteins. *Virology* **15**, 468-470.

Redrejo-Rodríguez, M. and Salas, M. L. (2014) Repair of base damage and genome maintenance in the Nucleo-Cytoplasmic Large DNA Viruses. *Virus Res.* **179**, 12-25.

Lacasta, A., Ballester, M., Monteagudo, P. L., Rodríguez, J. M., Salas, M. L., Accensi, F., Pina-Pedrero, S., Bensaid, A., Argilaquet, J., López-Soria, S., Hutet, E., Lepotier, M. F. and Rodríguez, F. (2014) Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus. *J. Virol.* **88**, 13322-13332.

Alejo, A., Andrés, G., del Rosal, M. and Salas, M. L. (2013) African swine fever virus polyprotein processing proteinase. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, pp. 2385-2390.

Otras actividades / Other activities

Co-dirigió el Curso "Nuevas perspectivas en Biomedicina" de la Escuela de Biología Molecular "Eladio Viñuela". Universidad Internacional Menéndez Pelayo (2013).

Presidenta del Comité Organizador del XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) (2013).

Organizó la XI Semana de la Ciencia del Ayuntamiento de Lueca. Asturias (2013).

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 (2013-14).

Co-dirigió el Curso "Retos en Biomedicina molecular en la segunda década del siglo XXI" de la Escuela de Biología Molecular "Eladio Viñuela". Universidad Internacional Menéndez Pelayo (2014).

Organizó la XII Semana de la Ciencia del Ayuntamiento de Lueca. Asturias (2014).

Premios / Awards

Premio Madrid 2012 a la mejor patente, otorgado por la Fundación Madrid para el conocimiento. (2013).

Miembro de Honor del Senatium Científico de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza. (2013-).

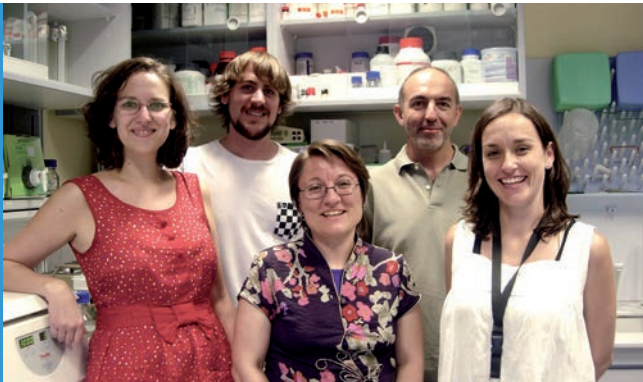
Profesora Honoraria del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid (2013-14).

Premio a la Excelencia Química concedido por el Consejo General de Colegios Oficiales de Químicos de España (2014).

Tesis doctorales / Doctoral theses

David Ballesteros Plaza (2014) Estudio funcional de las proteínas p1 y p17 del bacteriófago ϕ 29. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Margarita Salas Falgueras y Daniel Muñoz Espín.

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 estudia los mecanismos que las células eucarióticas utilizan para prevenir la inestabilidad genómica, una causa importante del envejecimiento y de enfermedades como el cáncer. Estudiamos principalmente cómo se mantiene la integridad del genoma durante la replicación cromosómica, especialmente bajo condiciones de daño en el DNA o estrés replicativo. Los aspectos fundamentales de estos procesos están conservados evolutivamente, lo que nos permite utilizar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo.

Durante este periodo hemos continuado el estudio de la función y regulación de la ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el DNA. Hemos encontrado que Rad5^{HLTF/SHPRH}, que media la rama libre de errores de esta ruta, tiene un papel principal en la respuesta al daño en el DNA durante la replicación. Rad5 es necesaria para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS, alcanza niveles máximos durante la fase S y forma focos en presencia de daño en el DNA. Rad5 asegura que la replicación cromosómica se complete cuando existen lesiones en el DNA, reduciendo el riesgo de mutagénesis y contribuyendo así al mantenimiento de la integridad del genoma.

Hemos ampliado también el estudio de la endonucleasa Mus81-Mms4^{EME1}, mostrando que es necesaria para finalizar la replicación cromosómica y para la supervivencia celular cuando el DNA está dañado. Hemos encontrado que Mus81-Mms4 se activa al final de la fase S y que ejecuta su función después de que la mayor parte de la replicación del genoma haya finalizado. Este modo de acción impide la acción de Mus81-Mms4 durante la fase S y por tanto la potencial inestabilidad genómica derivada de su función nucleolítica. Al mismo tiempo, constituye un mecanismo que asegura el procesamiento de intermediarios de DNA que puedan permanecer después de la replicación y necesiten resolverse antes de la mitosis.

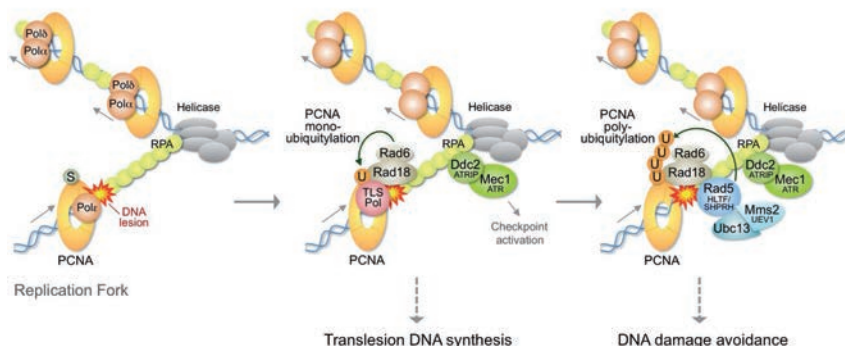


Figura 1. Representación esquemática de los procesos que desencadenan la respuesta de tolerancia al daño en el DNA.

Figure 1. Schematic illustration of the processes triggering the DNA damage tolerance response.

Research summary

Our group studies the mechanisms by which eukaryotic cells prevent genomic instability, an important cause of aging and diseases such as cancer. We mainly study how genome integrity is maintained during chromosome replication, especially under conditions of DNA damage or replicative stress. The basic aspects of these processes are evolutionarily conserved, which allows us to use the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism.

During this period we have continued the study of the function and regulation of the RAD6/RAD18 pathway of DNA damage tolerance. We have found that Rad5^{HITF/SHPRH}, which mediates the error-free branch of this pathway, has a major role in the response to DNA damage during replication. Rad5 is required for the progression of replication forks through MMS-damaged DNA, reaches maximum levels during S phase and forms foci in the presence of DNA damage. Rad5 ensures the completion of chromosome replication under DNA-damaging conditions, reducing the risk of mutagenesis and thereby contributing to genome integrity maintenance.

We have also expanded the study of the Mus81-Mms4^{EME1} endonuclease, showing that it is required for the completion of chromosome replication and for cell survival when the DNA is damaged. We have found that Mus81-Mms4 gets activated at the end of S-phase and that it executes its function after the bulk of genome replication has finished. This mode of action prevents Mus81-Mms4 action during S phase and therefore the potential genomic instability derived from its nucleolytic function. At the same time, it is an efficient fail-safe mechanism for processing DNA intermediates that can persist after replication and need to be resolved before mitosis.

Publicaciones / Publications

Ortiz-Bazán, M. A., Gallo-Fernández, M., Saugar, I., Jiménez-Martín, A., Vázquez M. V. and Tercero, J. A. (2014) Rad5 plays a major role in the cellular response to DNA damage during chromosome replication. *Cell Rep.* **9**, 460-468.

Saugar, I., Ortiz-Bazán, M. A. and Tercero, J. A. (2014) Tolerating DNA damage during eukaryotic chromosome replication. *Exp. Cell Res.* **329**, 170-177.

Saugar, I., Vázquez, M. V., Gallo-Fernández, M., Ortiz-Bazán, M. A., Segurado, M., Calzada, A. and Tercero, J. A. (2013) Temporal regulation of the Mus81-Mms4 endonuclease ensures cell survival under conditions of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8943-8958.

Tesis doctorales / Doctoral theses

María Ángeles Ortiz Bazán (2014). Análisis del papel de los componentes de la ruta RAD6/RAD18 de *Saccharomyces cerevisiae* en la tolerancia al daño en el DNA durante la replicación cromosómica. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José Antonio Tercero.

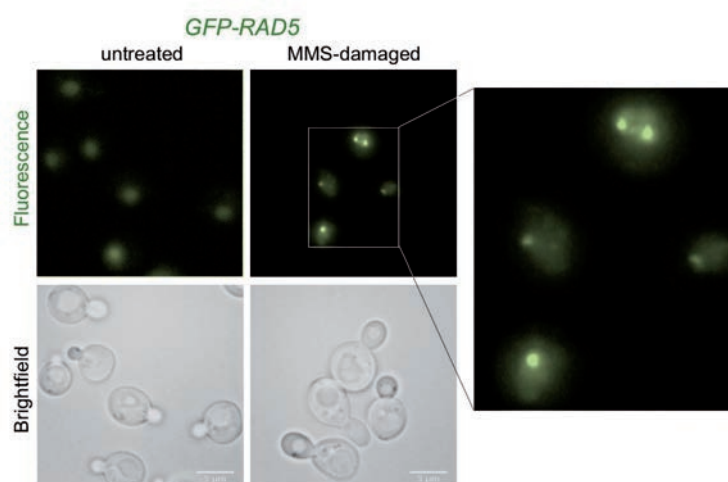


Figura 2. La proteína Rad5 se acumula y forma focos nucleares en respuesta a la presencia de daño en el DNA.

Figure 2. The Rad5 protein accumulates and forms nuclear foci in response to the presence of DNA damage.

Grupo Reparación del DNA bacteriano

Repair of bacterial DNA group



Jefe de Línea / Group Leader:

Miguel de Vega José

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:

Olga Zafra Amorós

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Ana de Ory López

Resumen de investigación

Nuestro principal objetivo es el estudio a nivel molecular de las proteínas responsables de la estabilidad genética en bacterias mediante el desarrollo de ensayos funcionales de proteínas de reparación de la bacteria modelo *Bacillus subtilis*, cuyas células vegetativas y esporas están expuestas a condiciones medioambientales extremas, causantes de múltiples daños en el DNA.

En estos dos años hemos analizado *in vitro* las propiedades funcionales de la Ligasa D de *B. subtilis* (BsuLigD) y de la proteína Ku (BsuKu) que constituyen el sistema de reparación de roturas de DNA mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) en esta bacteria. Hemos mostrado que las características bioquímicas esenciales de BsuLigD están de acuerdo con una función en NHEJ: 1) polimerización con inserción preferente de NTPs, 2) reconocimiento específico del grupo fosfato en el extremo 5' downstream, 3) actividad ligasa, 4) capacidad de promover realineamientos de las cadenas iniciadora y molde durante la elongación de extremos 3' desapareados, y 5) es reclutada a los extremos de las roturas de DNA por BsuKu, que estimula las actividades de polimerización y ligasa del enzima.

Hemos mostrado que la proteína BsuKu, además de su papel clave en permitir la unión de dos extremos de DNA por BsuLigD, está provista de una actividad AP/deoxyribosa 5'-fosfato (5'-dRP)-lyasa que puede actuar sobre sitios abásicos presentes en moléculas de ssDNA y de dsDNA. La coordinación de esta actividad con las de polimerización y ligasa de BsuLigD hace que BsuKu sea capaz de cooperar en el procesamiento de sitios abásicos durante la reacción de NHEJ. Nuestros resultados mostraron que esta actividad no está restringida a *B. subtilis* sino que está presente en la proteína Ku de la bacteria filogenéticamente distante *Pseudomonas aeruginosa*, lo que nos permite extrapolar nuestras observaciones al resto de miembros bacterianos que presenten el sistema de reparación NHEJ.

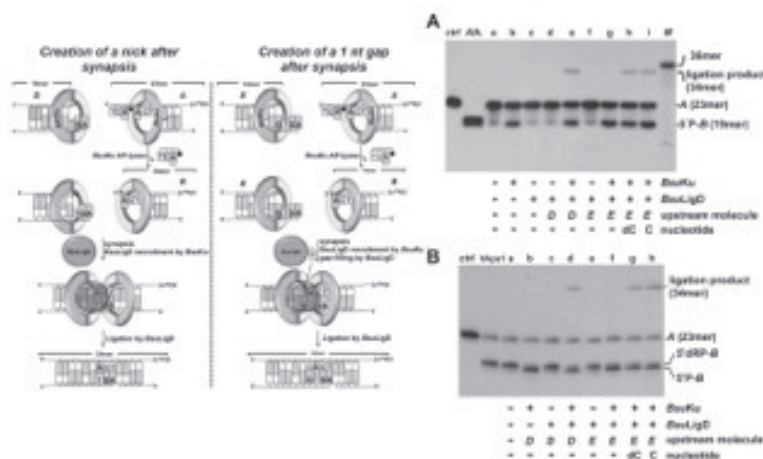


Figura 1. Unión de extremos de DNA parcialmente complementarios con sitios abásicos (AP) terminales. Panel de la izquierda, representación esquemática de la reacción de end-joining, indicando los diferentes sustratos (sitios AP: círculos negros), productos y reacciones catalíticas que tienen lugar. (A) La reacción de unión de extremos requiere el procesamiento previo de los sitios AP por Ku y posterior ligación por LigD. (B) Unión de extremos en los que la molécula downstream porta un residuo 5'-dRP.

Figure 1. End joining of partially complementary DNA ends with near terminal AP sites. Left panel, schematic representation of the end-joining reaction, indicating the different substrates (filled circle represents an abasic site), products and the catalytic reactions that take place. (A) The end joining reaction requires the previous processing of the AP sites by Ku and further ligation by LigD. (B) End joining with a downstream DNA molecule bearing a protruding 5'-dRP end.

Research summary

Our main objective is to get insights on the molecular mechanisms responsible for maintaining genetic information in bacteria, by functional analysis of purified repair proteins from the bacterium *Bacillus subtilis* whose vegetative cells and spores have to deal with DNA damage induced by extreme environmental conditions.

During these two years we have analyzed in vitro the functional properties of *B. subtilis* Ligase D (BsuLigD) and Ku (BsuKu) that constitute a minimal nonhomologous end joining (NHEJ) system in this bacterium. Our results have shown that the essential biochemical signatures exhibited by BsuLigD agree with its proposed function in NHEJ: 1) inherent polymerization activity showing preferential insertion of NMPs, 2) specific recognition of the phosphate group at the downstream 5' end, 3) intrinsic ligase activity, 4) ability to promote realignments of the template and primer strands during elongation of mispaired 3' ends, and 5) it is recruited to DNA by BsuKu that stimulates the inherent polymerization and ligase activities of the enzyme allowing it to deal with and to hold different and unstable DNA realignments.

Additionally, we have shown that BsuKu, along with its pivotal role in allowing joining of two broken ends by BsuLigD, is endowed with an AP/deoxyribose 5'-phosphate (5'-dRP)-lyase activity that can act on ssDNA, nicked molecules and DNA molecules without ends. Coordination with BsuLigD makes this protein able to cooperate in processing of AP sites during the NHEJ pathway. Our results showed that this activity is not restricted to *B. subtilis* as is also present in the Ku protein of the phylogenetically distant bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, allowing us to expand our observations to other bacterial members provided with an NHEJ system.

Publicaciones / Publications

de Vega, M. (2013) The Minimal *Bacillus subtilis* Nonhomologous End Joining Repair Machinery. *PLoS ONE* **8**(5): e64232.

del Prado, A., Lázaro, J.M., Villar, L., Salas, M. and de Vega, M. (2013) Dual Role of ϕ 29 DNA Polymerase Lys529 in Stabilisation of the DNA Priming-Terminus and the Terminal Protein-Priming Residue at the Polymerisation Site. *PLoS ONE* **8**(9): e72765.

Santos, E., Lázaro, J.M., Salas, M. and de Vega, M. (2014) Role of the LEXE Motif of Protein-primed DNA Polymerases in the Interaction with the Incoming Nucleotide. *J. Biol. Chem.* **289**, 2888-2898.

de Ory, A., Zafra, O. and de Vega, M. (2014) Efficient processing of abasic sites by bacterial nonhomologous end-joining Ku proteins. *Nucleic Acids Res.* **42**, 13082-13095.

Premios / Awards

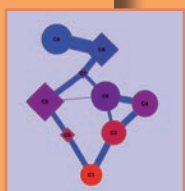
IX Premio Madrid+d a la mejor patente "Chimeras of phage ϕ 29 DNA polymerase".

IX Award Madrid+d to the best patent "Chimeras of phage ϕ 29 DNA polymerase".

168

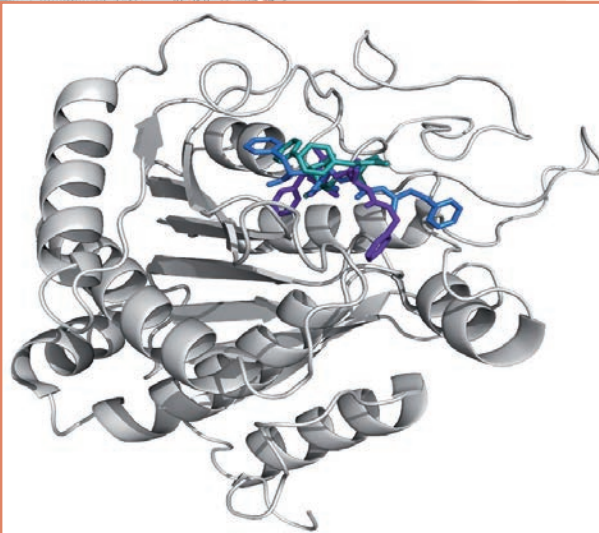
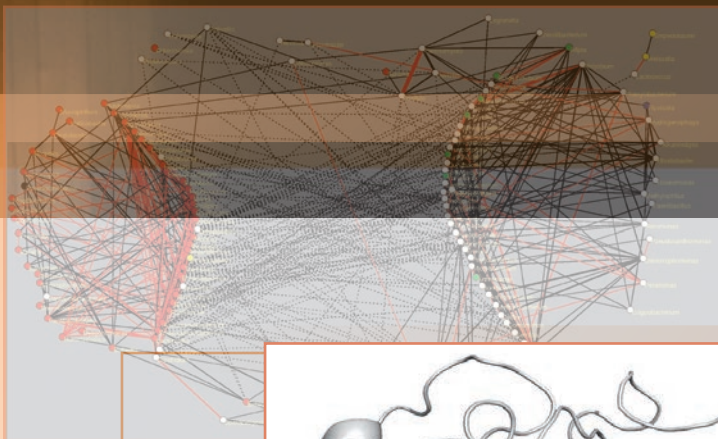
Unidad de Bioinformática
Bioinformatics Unit

UGO BASTOLLA BUFALINI



UNIDAD DE BIOINFORMÁTICA / *BIOINFORMATICS UNIT*

UNIDAD DE BIOINFORMÁTICA



Bioinformatics Unit

BIOLOGÍA COMPUTACIONAL Y BIOINFORMÁTICA

COMPUTATIONAL BIOLOGY AND BIOINFORMATICS



Jefe de Unidad / Unit Leader:
Ugo Bastolla Bufalini

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Miguel Arenas Busto
(Contratado Juan de la Cierva)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Álvaro Cortés Cabrera
Helena Gomes Dos Santos
Javier Klett Arroyo
Alberto Pascual García

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Alfonso Núñez Salgado

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Agustín Sánchez Cobos
Pavel Baykalov

Resumen de investigación

A finales de 2012, el Dr. Antonio Morreale y su línea de investigación sobre diseño de fármacos han dejado de pertenecer al CBMSO. Ha sido una gran pérdida para el centro y para nuestro grupo en particular, aunque sus publicaciones han seguido apareciendo. Nuestros intereses restantes se pueden dividir en cuatro líneas:

- 1) Estudio de dinámica de proteínas con modos normales del modelo de red elástica de ángulos de torsión que hemos desarrollado. Nuestro objetivo último es predecir la dinámica funcional de las proteínas investigando los acoplamientos dinámicos entre residuos y caracterizando e intentando predecir cambios de conformación funcionales, y caracterizar cambios de estructura en la evolución.
- 2) Relación entre la estabilidad termodinámica de las proteínas y la evolución: Hemos desarrollado métodos para predecir la estabilidad de plegamiento y los efectos de las mutaciones, y los aplicamos al estudio de la evolución de proteínas, para detectar selección positiva (que estabiliza la estructura nativa) y negativa (que desestabiliza los plegamientos incorrectos), modelar matemáticamente la evolución con selección sobre estabilidad y aplicarla a inferencia filogenética, estudiar la relación entre estabilidad y procesos de mutación (sesgo de G+C, sesgo de inserción y eliminación), y predecir acoplamientos estructurales y funcionales entre residuos.
- 3) Ecología teórica: queremos entender que propiedades favorecen la estabilidad estructural y la persistencia de los ecosistemas. Con este objetivo, estudiamos el efecto combinado de competición y mutualismo mediante modelos matemáticos, y hemos desarrollado un procedimiento para predecir las interacciones ecológicas entre bacterias a partir de sus patrones ambientales.
- 4) Epigenómica: Hemos desarrollado un nuevo método para caracterizar los estados de cromatina con un Hidden Markov Model a partir de datos de Chip-Seq de marcas epigenéticas, que hemos aplicado a *A.thaliana* en colaboración con el grupo del Professor Crisanto Gutierrez, y estudiamos la relación entre los estados de cromatina, la transcripción, y los orígenes de replicación.

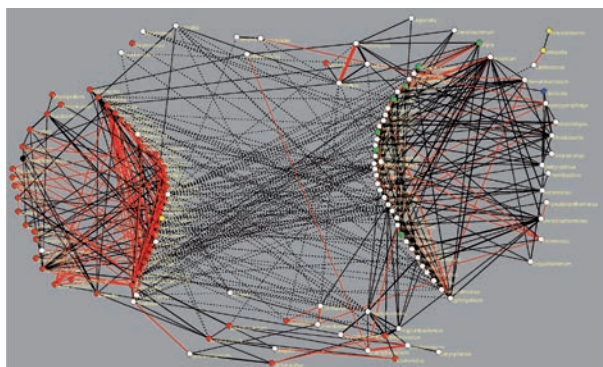


Figura 1. Red que representa las relaciones sinérgicas y competitivas que predecimos entre bacterias encontradas en la secuenciación de muestras provenientes de intestinos animales.

Figure 1. Network representing predicted synergetic and competitive relationships between bacteria found sequencing samples coming from animal guts.

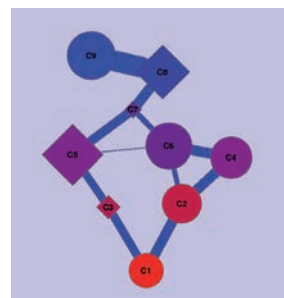


Figura 2. Red que representa la contigüidad espacial entre estados de cromatina de *A.thaliana*. Los estados 1,2,3,4,6 corresponden a estados génicos y promotores, 5,7 son estados reprimidos por Polycomb y 8,9 son estados de heterocromatina.

Figure 2. Network representing proximity relationships between Chromatin states of *A.thaliana*. States 1,2,3,4,6 correspond to genic states and promoters, 5,7 are states repressed by PolyComb, 8,9 are heterochromatin states.

Research summary

At the end of 2012, Dr. Antonio Morreale and his research group on computational drug design had to leave the CBMSO. This was an important loss for the Center, and for our group in particular. Nevertheless, several papers of Antonio are still appearing in these years. Our remaining research interests can be grouped in four lines:

- 1) *Study of protein dynamics through the normal modes of the elastic network model of torsion angles that we developed. Our final objective consists in predicting the functional dynamics of proteins studying the dynamical couplings between residues and characterizing and trying to predict functional conformation changes and changes of structures in protein evolution.*
- 2) *Relationship between thermodynamic stability of proteins and evolution: We developed methods to predict protein stability and the thermodynamic effect of mutations, and we apply them to the study of protein evolution, to detect positive selection (stabilizing the native state) and negative selection (destabilizing misfolded conformations), to model protein evolution with structural constraints and apply those mathematical models to phylogenetic inference, to study the relationship between stability and mutation processes (G+C bias, insertion and deletion bias), and to predict functional and structural couplings between residues.*
- 3) *Theoretical ecology: We aim to understand which properties favour the structural stability and the persistence of ecosystems. With this objective, we study the combined effect of competition and mutualism through mathematical models, and we developed a procedure to predict ecological interactions between bacteria from their environmental patterns.*
- 4) *Epigenomics: We developed a new method to characterize chromatin states through a Hidden Markov Model from Chip-Seq data of epigenetic data, which we applied to *A.thaliana* in collaboration with the group of Professor Crisanto Gutierrez, and we study the relationship between chromatin states, gene transcription and replication origins.*

Publicaciones / Publications

- Pascual-García, A., Tamames, J. and Bastolla U. (2014) Bacteria dialog with Santa Rosalia: Are aggregations of cosmopolitan bacteria mainly explained by habitat filtering or by ecological interactions? *BMC Microbiol.* **14**, 284.
- Bastolla U. (2014) Computing protein dynamics from protein structure with elastic network models. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **4**, 488–503.
- Treviño, M.A., García-Mayoral, M.F., Jiménez M.Á., Bastolla, U. and Bruix M. (2014) Emergence of structure through protein-protein interactions and pH changes in dually predicted coiled-coil and disordered regions of centrosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 1808–19.
- Bastolla, U. (2014). Detecting selection on protein stability through statistical mechanical models of folding and evolution. *Biomolecules*. **4**, 291–314.
- Sequeira-Mendes, J., Aragüez, I., Peiró, R., Méndez-Giraldez, R., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Bastolla, U. and Gutierrez, C. (2014) The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States. *Plant Cell* **26**, 2351–2366.
- Arenas, M., Dos Santos, H.G., Posada, D. and Bastolla, U. (2013) Protein evolution along phylogenetic histories under structurally constrained substitution models. *Bioinformatics* **29**, 3020–8.
- Lombráña, R., Almeida, R., Revuelta, I., Madeira, S., Herranz, G., Saiz, N., Bastolla, U. and Gómez, M. (2013) High-resolution analysis of DNA synthesis start sites and nucleosome architecture at efficient mammalian replication origins. *EMBO J.* **32**:2631–44.
- Dos Santos, H.G., Abia, D., Janowski, R., Mortuza, G., Bertero, M.G., Boutin M, Guarín N, Méndez-Giraldez R, Nuñez A, Pedrero JG, Redondo P, Sanz M, Speroni S, Teichert F, Bruix M, Carazo JM, Gonzalez C, Reina J, Valpuesta JM, Vernos I, Zabala JC, Montoya G, Coll M, Bastolla, U. and Serrano, L. (2013) Structure and non-structure of centrosomal proteins. *PLoS One* **8**:e62633.
- Bastolla, U., Porto, M. and Roman, H.E. (2013) The emerging dynamic view of proteins: protein plasticity in allostery, evolution and self-assembly. *Biochim Biophys Acta*. **1834**, 817–9.
- Dos Santos, H.G., Klett, J., Méndez, R. and Bastolla, U. (2013) Characterizing conformation changes in proteins through the torsional elastic response. *Biochim Biophys Acta*. **1834**:836–46.
- Minning, J., Porto, M. and Bastolla, U. (2013) Detecting selection for negative design in proteins through an improved model of the misfolded state. *Proteins* **81**, 1102–12.
- Lopes, J.S., Arenas, M., Posada, D. and Beaumont, M.A. (2014) Coestimation of Recombination, Substitution and Molecular Adaptation rates by approximate Bayesian computation. *Heredity* **112**, 255–264.
- Arenas, M. and Posada, D. (2014) Simulation of Genome-wide Evolution under Heterogeneous Substitution models and Complex Multispecies Coalescent Histories. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 1295–1301.
- Benguigui, M. and Arenas, M. (2014) Spatial and Temporal Simulation of Human Evolution. Methods, Frameworks and Applications. *Current Genomics* **15**, 245–255.
- Arenas, M. and Posada, D. (2014) The influence of recombination on the estimation of selection from coding sequence alignments. In "Natural Selection: Methods and Applications". Ed., Fares, M.A. *CRC Press/Taylor & Francis*. Pp. **112–125**.
- Arenas, M. (2013) Computer programs and methodologies for the simulation of DNA sequence data with recombination. *Frontiers in Genetics* **4**, 9.
- Arenas, M. (2013) The Importance and Application of the Ancestral Recombination Graph. *Frontiers in Genetics* **4**, 206.

- Willemen, H.L., Campos, P.M., Lucas, E., Morreale, A., Gil-Redondo, R., Agut, J., González, F.V., Ramos, P., Heijnen C, Mayor F Jr, Kavelaars A. and Murga, C. (2014) A novel p38 MAPK docking-groove-targeted compound is a potent inhibitor of inflammatory hyperalgesia. *Biochem J.* **459**, 427–39.
- Klett, J., Cortés-Cabrera, A., Gil-Redondo, R., Gago, F. and Morreale, A. (2014) ALFA: automatic ligand flexibility assignment. *J Chem Inf Model.* **54**, 314–23.
- Fulde M, Bernardo-García N, Rohde M, Nachtigall N, Frank R, Preissner KT, Klett J, Morreale A, Chhatwal GS, Hermoso JA, and Bergmann S (2014) Pneumococcal phosphoglycerate kinase interacts with plasminogen and its tissue activator. *Thromb Haemost.* **111**, 401–16.
- Marcelo F, Huecas S, Ruiz-Ávila LB, Cañada FJ, Perona A, Poveda A, Martín-Santamaría S, Morreale A, Jiménez-Barbero J and Andreu, J.M. (2013) Interactions of bacterial cell division protein FtsZ with C8-substituted guanine nucleotide inhibitors. A combined NMR, biochemical and molecular modeling perspective. *J Am Chem Soc.* **135**, 16418–28.
- Alvarez-Navarro, C., Cragnolini JJ, Dos Santos HG, Barnea E, Admon A, Morreale A, and López de Castro, J.A. (2013) Novel HLA-B27-restricted epitopes from *Chlamydia trachomatis* generated upon endogenous processing of bacterial proteins suggest a role of molecular mimicry in reactive arthritis. *J Biol Chem.* **288**, 25810–25.
- Cortés-Cabrera, A., Morris, G.M., Finn, P.W., Morreale, A. and Gago, F. (2013) Comparison of ultra-fast 2D and 3D ligand and target descriptors for side effect prediction and network analysis in polypharmacology. *Br J Pharmacol.* **170**, 557–67.
- Coderch, C., Tang Y, Klett J, Zhang SE, Ma YT, Shaorong W, Matesanz R, Pera B, Canales A, Jiménez-Barbero, J., Morreale, A., Díaz JF, Fang WS and Gago, F. (2013) A structure-based design of new C2- and C13-substituted taxanes: tubulin binding affinities and extended quantitative structure-activity relationships using comparative binding energy (COMBINE) analysis. *Org Biomol Chem.* **11**, 3046–56.

Otras actividades / Other activities

Organización de eventos:

Encuentro de grupos de biología computacional de la UAM "Computational Biology @ UAM", CBMSO, 5 de junio de 2013.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Javier Klett Arroyo (21 de Julio de 2013). Desarrollo y Aplicación de Herramientas para la Modelización y Simulación de Interacciones Moleculares. UAM. Dr. Antonio Morreale.

Helena Gomes Dos Santos (22 de Noviembre de 2013). Hacia una visión más dinámica de la bioinformática estructural en el diseño de fármacos y avances en la terapia personalizada: desarrollo y aplicaciones. UAM. Dr. Ugo Bastolla y Dr. Antonio Morreale

Álvaro Cortés Cabrera (29 de Noviembre de 2013). Desarrollo de una plataforma informática para la búsqueda de nuevos fármacos. UAM. Prof. Federico Gago y Dr. Antonio Morreale.

172

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

Secretaría Técnica /
Technical Secretary:
Almudena Hernando Bellido

Personal Científico /
Scientific Staff:
Antonio Jesús Crespillo Alguacil

Colaboradores / *Collaborators:*
Florencia Cavodeassi Madarro
Elena Campos Sánchez

www.uam.es/ja.lopez

Resumen de investigación

Dentro del programa de Divulgación y Fomento de la Ciencia, el Departamento de Cultura Científica del CBMSO (DCC-CBMSO) ha participado en las siguientes actividades (2013-14): 1) XIII (2013) y XIV (2014) Semanas de la Ciencia de Madrid. El CBMSO ha participado con varios proyectos financiados por FECYT 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://web4.cbm.uam.es/joomla-rl/index.php/es/servicios/cultura-cientifica?id=1175>). 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) Participación en la Feria "Madrid Finde Científico Alcobendas 2014". 7) Organización (2013-2014) del curso de biotecnología "Biotechnology Explorer" para profesores de secundaria. 8) Finalmente, como miembro del CBMSO, el director del DCC colabora periódicamente en temas científicos y biotecnológicos como el suplemento "El Cultural", la revista de cultura científica *Journal of Feelsynapsis* y *Principia*, con TVE (La 2), Radio Nacional de España (Radio 5 –"Entre Probetas" y "El Laboratorio de JAL"-, Radio 1 –"A Hombros de Gigantes"- y Radio Exterior –"Marca España"-) y Radio Utopía.

Más información: <http://web4.cbm.uam.es/joomla-rl/index.php/es/servicios/cultura-cientifica>

Por otra parte, en investigación, el grupo de neurovirología está estudiando el papel de la infección por virus HSV-1 en neurodegeneración, desmielinización y transcitosis en células oligodendrocíticas inmaduras o diferenciadas a células productoras de Mielina. Junto a la susceptibilidad celular, también se ha estudiado el papel de los principales receptores virales. En general, los resultados revelan que tanto la línea celular HOG como oligodendrocitos primarios se vuelven más susceptibles a la infección tras la diferenciación. Por otra parte, la propia infección viral induce cambios morfológicos compatibles con la diferenciación celular. Los receptores virales HVEM y nectina-1 son funcionales en células HOG. Finalmente, la electromicroscopía indica que HSV-1 podría entrar en los oligodendrocitos mediante macropinocitosis.



Figura 1. Participación en la Feria "Madrid Finde Científico Alcobendas 2014".

Figure 1. Participation in the Madrid Science Fair "Alcobendas Weekend Science Fair 2014".

Research summary

Within the framework of the CBMSO Scientific Culture Program, The Department of Scientific Culture of the CBMSO (DCC-CBMSO) has collaborated in the following activities (2013-14): 1) XIII (2013) and XIV (2014) Scientific Weeks in Madrid. In this regard, several projects were carried out in the CBMSO –some of them financially supported by FECYT (Spanish Foundation for Science and Technology)–, complementing the 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 Madri+d 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://web4.cbm.uam.es/joomla-rl/index.php/es/servicios/cultura-cientifica?id=1175>). 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) Participation in the Madrid Science Fair “Alcobendas Weekend Science Fair 2014”. 7) Organization (2013-2014) and coordination of the “Biotechnology Explorer” course for secondary school teachers. 8) Finally, as a CBMSO member, the DCC Director periodically collaborates with the magazine “El Cultural”, The Journal of Feelsynapsis and Principia –aimed to items of scientific culture –, the Spanish National TV (TVE; La 2), the Spanish National Radio (Radio 5 –“Entre Probetas” and “El Laboratorio de JAL”–, Radio 1 –“A Hombros de Gigantes- and Radio Exterior –“Marca España”–) and Radio Utopía.

Further information: <http://web4.cbm.uam.es/joomla-rl/index.php/es/servicios/cultura-cientifica>

Moreover, the research group of NeuroVirology-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. In addition to cell susceptibility, the role of the major cell receptors for viral entry was assessed. In general, the results revealed that OPC (oligodendrocyte precursor cells) and HOG cells cultured under differentiation conditions became more susceptible to HSV-1. On the other hand, viral infection induced morphological changes corresponding to differentiated cells, suggesting that HSV-1 might be inducing cell differentiation. Colocalization of HVEM and nectin-1 with viral particles, suggesting that these two major HSV-1 receptors are functional in HOG cells. Finally, electron microscopy assays indicated that HSV-1 may be also entering OLs by macropinocytosis depending on their differentiation stage.

Publicaciones / Publications

Científicas/Scientific:

Bello-Morales R, Antonio Jesús Crespiño, Beatriz García, Luis Ángel Dorado, Beatriz Martín, Enrique Tabarés, Claude Krummenacher, Fernando de Castro and López-Guerrero JA. (2014). “The effect of cellular differentiation on HSV-1 infection of oligodendrocytic cells”. *PLoS One*. 9:e89141.

Delgado-García M, Matesanz F, Alcina A, Fedetz M, García-Sánchez MI, Ruiz-Peña JL, Fernández O, Pinto Medel MJ, Leyva L, Arnal C, Delgado C, López Guerrero JA, González-Pérez A, Sáez ME, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, Picón C, Arroyo R, Varadé J, Urcelay E, Izquierdo G1, Lucas M. (2014) “A new risk variant for multiple sclerosis at the immunoglobulin heavy chain locus associates with intrathecal IgG, IgM index and oligoclonal bands”. *Mult. Scler*. Nov 12. pii: 1352458514556302.

Comunicación social de la Ciencia/Social communication of science:

Campos, E., López-Guerrero, J.A. (2013) “Células madre. Un futuro cada vez más cercano (II)”. *Journal of Feelsynapsis* 11:86-91

López-Guerrero, J.A. (2013). “Ciencia Expres”. Ed. Elam. ISBN: 978-84-936585-3-3.

Campos, E., López-Guerrero, J.A. (2013) “Células madre. Un futuro cada vez más cercano (III)”. *Journal of Feelsynapsis* 12:10-17

Campos, E., López-Guerrero, J.A. (2013) “Células madre. Un futuro cada vez más cercano (III)”. *Journal of Feelsynapsis* 13:11-13

López-Guerrero, J.A. (2013). “El experimento más importante se realiza sin controles”. *Journal of Feelsynapsis*, 13:39-48.

López Guerrero, J.A. and Bernardo Herradón (2013). “Breakthrough of the Year”. *An. Quím.* 109(4), 355–362.

López Guerrero, J.A. and Bernardo Herradón. (2014). “Hitos científicos de 2013”. *Journal of Feelsynapsis*, 14: 60-72.

López-Guerrero, J.A. (2014). “38th Annual International Herpesvirus Workshop 2014”. *Virología*, 17:26-27.

López-Guerrero, J.A. El Cultural:

- 11/01/2013 “Nuevos virus, viejas infecciones”
- 01/03/2013 “La familia SARS ataca de nuevo”
- 16/05/2013 “Clonación terapéutica versus clonación humana”
- 17/05/2013 “La gripe aviar no da respiro”
- 05/07/2013 “La genética pone al cáncer contra las cuerdas”
- 20/09/2013 “Sí, es una cuestión de sexo”...
- 08/11/2013 “Virus, de patógeno a herramienta”
- 27/12/2013 “Hitos del 2013”
- 28/02/2014 “De la Esclerosis Múltiple a la enfermedad de Crohn”
- 23/05/2014 “Ébola, MERS, Dengue... Guía viva de los virus”
- 12/08/2014 “Los puntos calientes del Ébola”
- 26/12/2014 “Hitos del 2014”

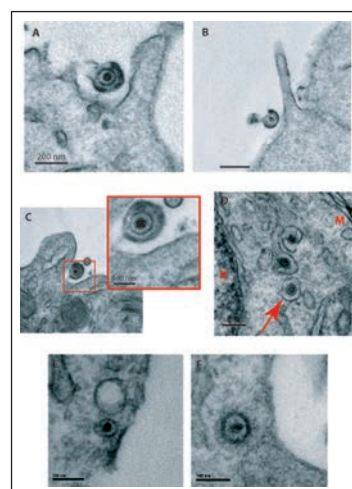
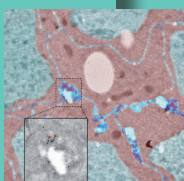


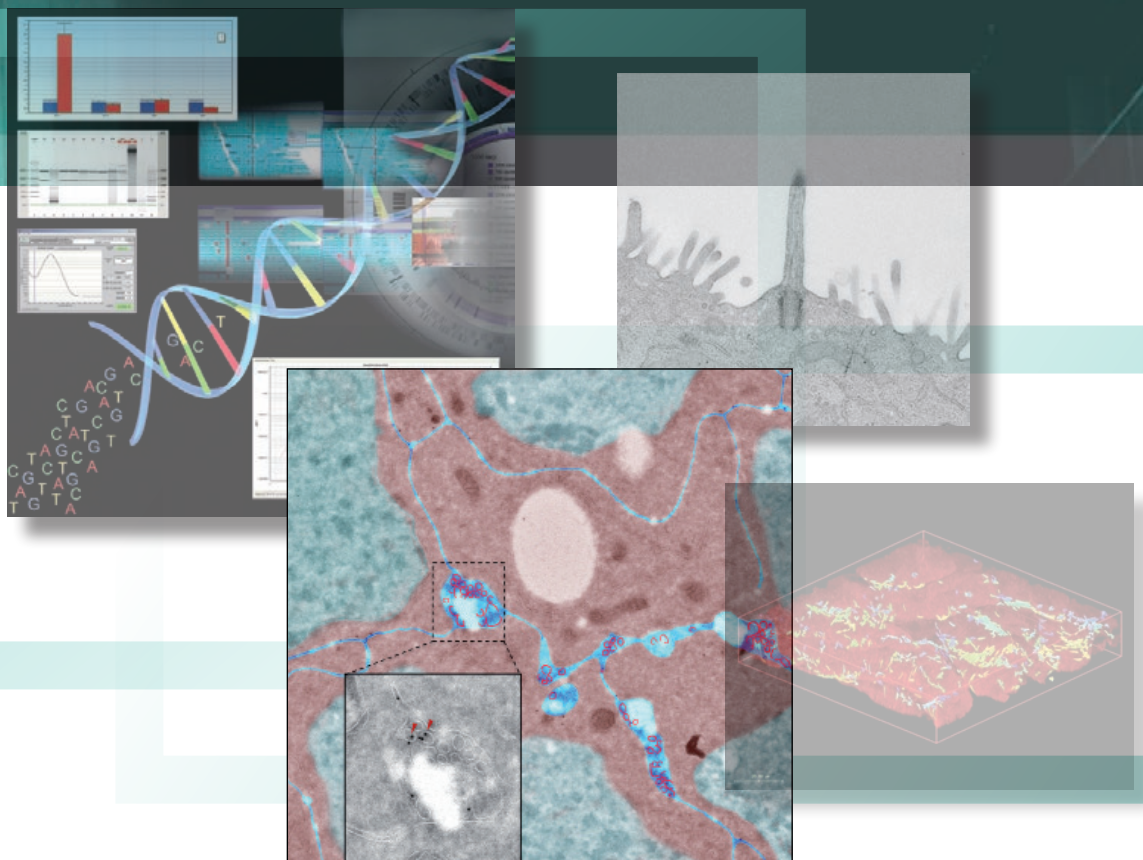
Figura 2. Infección de oligodendrocitos por HSV.

Figure 2. Infection of oligodendrocytes by HSV-1.

- 176 **Animalario**
Animal Facility
JAVIER PALACÍN URQUIJO
HELENA HEVIA HERNÁNDEZ
- 177 **Servicio de Bioinformática**
Bioinformatics Facility
DAVID ABIA HOLGADO
- 178 **Servicio de Citometría de Flujo**
Flow Cytometry Facility
BERTA RAPOSO PONCE
- 179 **Servicio de Fermentación**
Fermentation Facility
DIONISIO UREÑA RODRÍGUEZ
- 180 **Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva**
Genomics and Next-Generation Sequencing Facility
FERNANDO CARRASCO RAMIRO
- 181 **Servicio de Microscopía Electrónica (SME)**
Electron Microscopy Facility (EMF)
MARÍA TERESA REJAS MARCO
- 182 **Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)**
Optical and Confocal Microscopy Facility (SMOC)
CARLOS SÁNCHEZ MARTÍN
- 183 **Servicio de Química de Proteínas y Proteómica**
Proteomics and Protein Chemistry Core Facility
ANA ISABEL MARINA RAMÍREZ
- 184 **Servicio de Transgénesis**
Transgenesis Facility
M^a BELÉN PINTADO SANJUANBENITO



SERVICIOS CIENTÍFICOS



Scientific Facilities

ANIMALARIO

ANIMAL FACILITY



Director Técnico /

Technical Director:

Javier Palacín Urquijo

(Hasta diciembre 2013)

Dra. Elena Hevia Hernández

(Desde enero 2014)

Supervisor Científico /

Scientific Supervisor:

Dr. Antonio Alcamí Pertejo

Dr. César Coboleda

Asesor Veterinario en Salud Animal /

Animal Health Veterinary Advisor:

Dra. Elena Hevia Hernández

Responsable de Bienestar /

Welfare Supervisor:

Fernando Núñez Martín

(Desde marzo 2014)

Personal Técnico /

Technical Support:

Miguel Ángel Cobefia Chivato

(Hasta enero de 2014)

José María Sedano Torres

(Hasta junio de 2014)

Laura López Martínez

Marta González Mella

Macarena Quesada López

Beatriz García Martínez

M^a Eugenia Vera Meneses

(Vivotécnia)

Apoyo Administrativo /

Administrative Support:

Fernando García Muñoz

Miguel A. Bordallo Martín-Fontecha

Cuidadores de Animales /

Animal Keepers:

Luis Zorrilla Del Campo

Alfonso Gutiérrez García

Sonia Rubio Lago

(Hasta agosto 2014)

Personal de apoyo de la

empresa Vivotécnia /

Support staff of the Company

Vivotecnia

Descripción

Es una instalación moderna, diseñada y equipada con los últimos avances en este tipo de instalaciones. Su finalidad es la producción y mantenimiento de ratones, ratas y peces para su utilización con fines científicos. Para ello dispone de: Zona SPF para la producción de ratones modificados genéticamente. Zona convencional o de experimentación, para rata y ratón. Zonas con Nivel 2 de Biocontención (NBC 2), para ratón y rata. Zona con Nivel 3 de Biocontención (NBC 3), para ratones. Zona para animales acuáticos, peces y ranas. Laboratorios/ Quirófanos/ Salas de comportamiento. Dependencias para administración y servicios. Zona de lavado/ procesado del material: con túnel de lavado, lava-racks, sistema de aspiración de viruta, congeladores, equipo de higienización de agua, lava-biberones, etc. Zona técnica, con la maquinaria para mantener las condiciones ambientales.

Además disponemos de: racks ventilados, cabinas de seguridad biológica, cabinas de gases, autoclaves y SAS de gran capacidad, generadores de peróxido, equipo de imagen IVIS lumina, equipo generador de campos magnéticos, equipos de anestesia gaseosa, línea de CO₂, lupas, etc.

Description

It is a modern facility, designed and equipped with the latest advances in this type of facility. Its purpose is the production and maintenance of mice, rats and fish for scientific purposes. You can select from: SPF area for producing genetically-modified mice. Conventional experimental or testing area for rat and mouse. Biosecurity Level 2 area (BSL 2): for mouse and rat. Biosecurity Level 3 area (BSL 3): for mice. Area for aquatic animals, fish and frogs. Laboratories / Surgery rooms/ Behavior rooms. Dependencies for administration and services. Washing area/ material-processing: tunnel washer, cage and rack washers, chip extraction system, freezers, water sanitation equipment, bottle washers, etc. Technical area, with machinery to maintain adequate environmental conditions.

Also available: ventilated racks, safety cabinets, fume cupboards, sterilizers and high-capacity SAS, peroxide-generating equipment, IVIS Lumina imaging system, computers, magnetic field generator, gas anesthesia equipment, CO₂ line, magnifiers, etc.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

Rederivación de líneas de ratones modificados para su introducción a la zona de barrera y para su limpieza sanitaria.

Criopreservación de embriones y gametos de ratón.

Mantenimiento y producción de ratones en condiciones SPF, NBC2, NBC3 y convencionales.

Mantenimiento de ratas en condiciones convencionales y NBC2.

Mantenimiento y producción de peces cebra y medakas.

Mantenimiento de ranas *Xenopus*.

Gestión de colonias de ratones transgénicos.

Apoyo y asesoramiento técnico a los investigadores

Controles sanitarios de los animales, realizados de forma externa.

También se ofertan servicios a otros centros oficiales y a empresas privadas del sector interesadas en trabajar en nuestras instalaciones.

SERVICES

Rederivation of transgenic mice lines for introduction into SPF area and sanitary cleaning.

cryopreservation of mouse embryo and gametes.

Maintenance and production of mice under SPF, BSL2, BSL3 and conventional conditions.

Maintenance of rats under conventional and BSL2 conditions.

Maintenance and production of zebra and medaka fishes.

*Maintenance of *Xenopus* frogs.*

Management of transgenic mouse strains.

Support and technical advice to researchers.

Health monitoring reports of rats and mice (by an external service).

Also we offer service for other public institutions and firms interested in using our facilities.

SERVICIO DE BIOINFORMÁTICA

BIOINFORMATICS FACILITY

Director Técnico /
Technical Director:
David Abia Holgado

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. Ugo Bastolla Bufalini

Personal / *Personnel:*
Ramón Peiró Pastor
Alfonso Núñez Salgado

Página Web / *Web page:*
<http://ub.cbm.uam.es/services/services.php?menu=long>



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 científicos del Servicio 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 60TB y un servidor con 64GB de RAM dedicado principalmente a realizar análisis de secuenciación masiva y ensamblaje de genomas y que sirve como interfaz a las herramientas integradas en el paquete Galaxy.

Cursos: El personal del servicio participa de forma habitual en la impartición de clases en másters relacionados con bioinformática.

Description

The Bioinformatics facility supports research groups at the CBMSO by (a) performing bioinformatics analysis, (b) providing advice on the computational aspects of research projects, and (c) managing the hardware and software of common usage, in particular that involved in temporarily storing and analyzing data produced by the Next Generation Sequencing (NGS) machines that the center shares with other institutions.

Equipment: two PCs located in the facility, reserved for users willing to analyze their data with the assistance of the bioinformaticians, five high performance computation servers (with dual quad core processor and 24GB of RAM), one shared parallel file system with a capacity of 60 Terabytes for storing data from NGS experiments, one server supporting the Galaxy suite (an easy-to-use interface that facilitates the execution of a complete collection of programs for the analysis of NGS data, such as RNAseq, ChipSeq, resequencing and assembly of complete genomes, and access to several genomic databases).

PRESTACIONES DEL SERVICIO

a. Análisis de estructura de proteínas:

Búsqueda de proteínas similares en secuencia o estructura a la proteína problema.

Modelado por homología de estructura y complejos 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.

b. Secuenciación masiva:

Determinación de isoformas y cuantificación de niveles de expresión a partir de datos de RNA-seq

Ensamblaje *de novo* de plásmidos y genomas bacterianos

Predicción de sitios de unión de factores de transcripción y de las secuencias reconocidas por éstos a partir de datos de ChIP-seq

Identificación y cuantificación de taxones presentes en muestras ambientales a partir de datos de metagenómica

Mantenimiento del servidor Galaxy actualizando los programas y bases de datos subyacentes

c. Servicios computacionales y de asesoría:

Durante los años 2013 y 2014 los usuarios de los grupos de investigación del centro, excluyendo a los miembros del Servicio de Bioinformática y de la Unidad de Bioinformática, han utilizado 1'1 millones de horas de cálculo en el cluster gestionado por el servicio.

El personal del servicio asiste a los usuarios en la interpretación de datos obtenidos mediante diferentes técnicas, en el análisis estadístico de los mismos y mediante el desarrollo de programas específicos para su tratamiento.

SERVICES

a. 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 the 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.

b. Next generation sequencing:

Determination of isoforms and quantification of expression levels from RNA-seq data.

De novo assembly of plasmids and bacterial genomes.

Prediction of binding sites of transcription factors (TF) and sequences recognized by TF from data obtained by ChIP-seq.

Identification and quantification of taxa present in environmental samples from metagenomic data.

Maintenance and updating of Galaxy server software and underlying databases.

c. Computing services:

During the years 2013 and 2014 users of research groups from the center, excluding members of the Bioinformatics facility and of the Bioinformatics Unit, have used 1'1 million hours of calculation time in the cluster managed by the service.

The staff of the service assists users in the interpretation of data obtained by different techniques, in its statistical analysis and by developing specific programs for its treatment.

CITOMETRÍA DE FLUJO

FLOW CYTOMETRY FACILITY



Director Técnico /

Technical Director:

Dra. Berta Raposo Ponce

Supervisor Científico /

Scientific Supervisor:

Dra. María Luisa Toribio

Personal / Personnel:

Silvia Andrade Calvo

Página Web / Web page:

<http://www.cbm.uam.es/scf>

Descripción

El Servicio proporciona 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") utilizando parámetros de fluorescencia. Para las técnicas analíticas el Servicio cuenta con dos citómetros analógicos de dos láseres y cuatro detectores de fluorescencia (FACScalibur) cada uno; y dos citómetros digitales, uno de tres láseres y ocho detectores de fluorescencia (FACSCanto II) y otro de dos láseres y seis detectores de fluorescencia (FACSCanto A), todos ellos de la compañía Becton Dickinson. Disponemos asimismo de un separador celular de tres láseres y seis detectores de fluorescencia (FACSVantage SE) de la misma compañía. 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 softwares "FlowJo" (versión 6.4.1) y "CellQuestPro", y un PC equipado con una licencia de "FACSDiva" (versión 6.1.2) y dos de "FlowJo" (versión 7.6.5 y 10).

Description

The flow cytometry facility provides instrumentation and technical assistance to carry out immunophenotypic and functional analysis based on cellular parameters using flow cytometry techniques. We also perform cell-sorting techniques based on fluorescence parameters. The equipment available in our Facility includes two analogical cytometers with two lasers and four detectors (FACScalibur); two digital cytometers, one equipped with three lasers and eight fluorescence detectors (FACSCanto II) and the other with two lasers and six fluorescence detectors (FACSCanto A); and an analogical cell sorter with three lasers and six detectors (FACSVantage SE), all from Becton Dickinson. Data analysis can be carried out using PowerMac G5 and PowerMac G4 equipment running "FlowJo" (version 6.4.1) and "CellQuestPro" software, and a PC computer running "FACSDiva" (version 6.1.2) and "FlowJo" (version 7.6.5 and 10) software.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

Mantenimiento y calibración de los equipos analíticos.

Cursos de formación y manejo de los equipos de citometría analítica.

Gestión del uso de los equipos, contabilidad y facturación.

Mantenimiento y distribución de reactivos de citometría de flujo.

Soporte en adquisición de muestras en FACScalibur y FACSCanto.

Soporte en análisis de los resultados con diferentes softwares especializados.

Separación de subpoblaciones celulares en FACSVantage.

SERVICES

Maintenance and calibration of analytic equipment.

Training courses and supervision on analytical flow cytometry.

Administrative duties.

Maintenance of stocks and distribution of reagents for flow cytometry.

Training in sample acquisition in FACScalibur and FACSCanto equipment.

Training in analysis of results using specialized software.

Separation of cell populations by cell sorting (FACSVantage).

SERVICIO DE FERMENTACIÓN

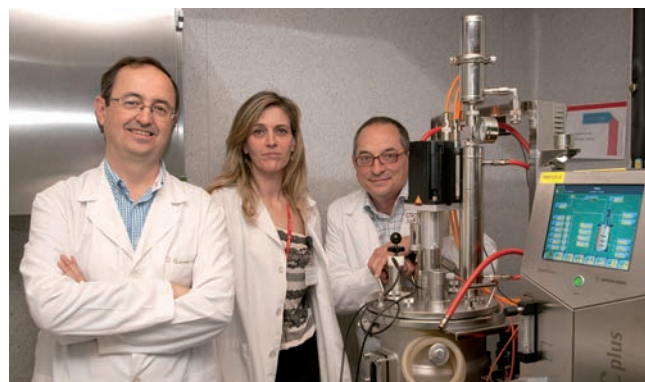
FERMENTACIÓN FACILITY

Director Técnico /
Technical Director:
 Dionisio Urefia Rodríguez

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
 Dr. José Berenguer Carlos

Personal / *Personnel:*
 María Isabel Carrascal Blanco

Página Web / *Web page:*
http://www2.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/plt_Servicio_Pagina.aspx?IdServicio=10&IdObjeto=251



Descripción

El Servicio de Fermentación principalmente tiene dos papeles en la actividad del CBMSO, uno centrado en el crecimiento de microorganismos naturales y recombinantes, y otro centrado en la producción de consumibles biológicos. A nivel de crecimiento de microorganismos, el Servicio de Fermentación proporciona asesoramiento sobre las cepas bacterianas apropiadas, plásmidos, sistemas de expresión, y condiciona para la superproducción de proteínas recombinante y escalado del proceso de producción desde Erlenmeyer a grandes fermentadores, permitiendo también el marcaje isotópico de la proteína expresada cuando se requiere para análisis estructural. Las instalaciones también permiten el cultivo de una gran variedad de microorganismos no recombinantes en grandes volúmenes. En todos los casos, en el crecimiento en fermentadores se supervisan los principales parámetros (temperatura, agitación, concentración de oxígeno, espuma y biomasa) cumpliendo las normas cGMP (current Good Manufacturing Practice).

Por otro lado, el Servicio de Fermentación proporciona preparaciones de diferentes cepas de *Escherichia coli* listas para su uso en clonaje de genes o expresión de proteína recombinante. También produce marcadores de tamaño de DNA para el uso por la mayoría de los grupos de investigación del CBMSO

Description

The Fermentation facility plays two main roles on the CBMSO scientific activities, one focused on the growth of natural and recombinant microorganisms, and the other centered on the production of biological consumables. At the level of microorganism growth, the Fermentation Facility provides advice on the appropriate bacterial strains, plasmid expression systems, and conditions for the overproduction of recombinant proteins and the scale up of the production process from Erlenmeyer to larger fermenters, allowing also the isotopic labeling of the expressed proteins when required for structural analysis. The facility also allows for the cultivation of a great variety of non-recombinant microorganisms in large volumes. In all cases, the growth in fermenters is monitored for the main parameters (temperature, stirring, pH, oxygen concentration, foam and biomass, in compliance with cGMP rules (current Good Manufacturing Practice).

On the other hand, the Fermentation Facility 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 size markers for the internal use by most of the research groups in the CBMSO.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

Cultivo de microorganismos en reactores de 4,10 y 30 litros.

Optimización y producción de proteínas recombinantes en cultivos de bacteria, hongos filamentosos o levaduras.

Procesos de escalado para sobreproducción en cultivos desde Erlenmeyer a fermentador de alta capacidad.

Marcaje isotópico para análisis estructural de proteínas expresadas en *E.coli*.

Células competentes *E.coli* preparadas para transformación.

Marcadores de tamaño de DNA.

Rotura de cultivos celulares mediante Prensa de French.

SERVICES

Cultures of microorganisms in 4, 10 or 30 liters reactors.

Improvement and production of recombinant proteins in cultures of bacteria, yeast or filamentous fungi.

Scale up for overproduction in cultures from Erlenmeyer to high capacity fermenter.

Isotope labeling of expressed proteins in *Escherichia coli* for structural analysis.

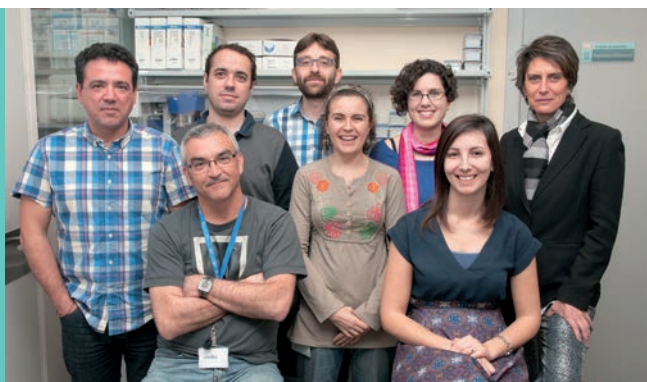
Ready-to-use *Escherichia coli* competent cells.

DNA molecular weight markers.

Disruption of cell cultures by French Press.

SERVICIO DE GENÓMICA Y SECUENCIACIÓN MASIVA

GENOMICS AND NEXT-GENERATION SEQUENCING FACILITY



Director Técnico /

Technical Director:

Fernando Carrasco Ramiro

Página Web / Web page:

<http://www.cbm.uam.es/genomica>

Supervisor Científico /

Scientific Supervisor:

Dra. Begoña Aguado Orea

Personal / Personnel:

Dra. Laura Tabera Moreno

Sandra Gonzalo Flores

Manuel Belda Ávila (Desde marzo de 2013)

Ramón Peiró Pastor (Desde septiembre de 2014)

Alberto Mudarra Rubio (Hasta abril de 2013)

Graciela Alonso Castro (Hasta enero de 2014)

Alberto Rastrojo (Desde octubre de 2013 hasta septiembre de 2014)

Descripción

El Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva es responsable de la implementación y desarrollo de tecnologías de biología molecular, genómica y secuenciación masiva (NGS), 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, ofrece asesoría en el diseño experimental de proyectos de NGS, media entre el usuario y las plataformas de NGS en la entrega de muestras y datos y es responsable del seguimiento de este tipo de proyectos. Además proporciona soporte técnico y análisis computacional de datos experimentales procedentes de experimentos de NGS y microarrays. Desde finales de 2014 coordina la participación de varios investigadores en el MinION Access Program de Oxford Nanopore. 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, genomic and Next-Generation Sequencing (NGS) 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, the facility offers advice on the experimental design for NGS technologies, mediates between the NGS platforms and the users with samples and data and is responsible for monitoring the development of the projects. Currently it also provides computational analysis of the data obtained from NGS and microarrays experiments. From 2014 the facility coordinates the participation of several CBMSO researchers in the MinION Access Program of Oxford Nanopore. 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 (NGS): 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.
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.) y mediante el uso de software diseñado por el servicio.
4. Análisis computacional (otras modalidades): análisis de datos procedentes de experimentos de microarrays mediante paquetes específicos, análisis estadísticos de datos experimentales, desarrollo de software a petición de usuarios, diseño de primers, formación en técnicas computacionales a usuarios internos y externos al CBMSO.
5. Acceso a los espectrofotómetros "Nanodrop" (2 equipos).
6. Acceso a extractor automático de ácidos nucleicos "Maxwell16 (Promega)".
7. Determinación de integridad de RNA en el equipo "Agilent bio-analyzer".
8. Acceso a termocicladores convencionales (3 equipos).
9. Acceso a termocicladores de tiempo real "Lightcycler" (3 equipos).
10. Acceso a termociclador de tiempo real "ABI 7900HT".
11. Acceso a los softwares "Pathway Studio" y "MedScan" e Ingenuity Pathway Analysis.

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,...), mediation in delivery of samples and data and follow-up of projects.
3. NGS computational analysis: alignments, assemblies, differential expression studies, biological diversity, and other aspects of NGS data using different software packages (Bowtie, Velvet, SOAP, TopHat, Cufflinks, QIIME, ...) as well as "in house" developed software.
4. Additional computational analysis: microarray data analysis with specialized packages, statistical analysis of experimental data, software development on demand, primer design and training in computational techniques for both internal and external researchers.
5. Access to the "Nanodrop" spectrophotometers (2 units).
6. Access to the "Maxwell16 (Promega)" automated nucleic acid extractor.
7. Determination of RNA integrity in the "Agilent bioanalyzer" equipment.
8. Access to conventional thermocyclers (3 units).
9. Access to "Lightcycler" real-time thermocyclers (3 units).
10. Access to "ABI 7900HT" real-time thermocycler.
11. Access to "Pathway Studio", "MedScan Reader" and Ingenuity Pathway Analysis softwares.

SERVICIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (SME)

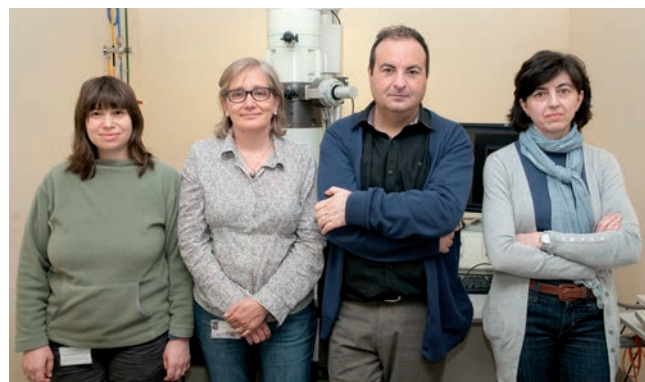
ELECTRON MICROSCOPY FACILITY (EMF)

Director Técnico /
Technical Director:
Dra. María Teresa Rejas Marco

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. Germán Andrés Hernández

Personal / *Personnel:*
Milagros Guerra Rodríguez
Lara María Rodenstein

Página Web / *Web page:*
http://www2.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/pli_Servicio.aspx?IdServicio=32



Descripción

El Servicio de Microscopía Electrónica (SME) proporciona apoyo científico-técnico a los grupos de investigación interesados en realizar microscopía electrónica de transmisión de complejos macromoleculares, virus, bacterias, células eucariotas y tejidos. Los métodos disponibles incluyen técnicas convencionales y criotécnicas de procesamiento de muestras biológicas como la criosustitución, la crioultramicrotomía 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. El SME dispone de un microscopio electrónico de transmisión de 100 kV equipado con una cámara digital (4k), un microscopio invertido de fluorescencia y equipos de criofijación por inmersión, criosustitución automática, ultramicrotomía convencional, crioultramicrotomía y criosecado. En el bienio 2013-2014, el SME ha realizado trabajos para más de 35 grupos del CBMSO y de 30 grupos de otras instituciones. Así mismo, el SME ha contribuido con su aportación a 25 publicaciones, participando como autores en las siguientes:

Alejo, A, Andrés G, del Rosal M, Salas, M. L. African swine fever virus processing peptidase. Handbook of proteolytic enzymes. 2013. Rawlings & Salvesen eds. Elsevier Science Ltd. ISBN :9780123822192. Academic Press.

Salas ML, Andrés G. African swine fever virus morphogenesis. Virus Res. 2013 Apr;173(1):29-41.

Almazán F, Dediego ML, Sola I, Zuñiga S, Nieto-Torres JL, Marquez-Jurado S, Andrés G, Enjuanes L. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. mBio. 2013 Sep 10;4(5):e00650-13.

Fiala GJ, Rejas MT, Schamel WW, van Santen HM. Visualization of TCR nanoclusters via immunogold labeling, freeze-etching, and surface replication. Methods Cell Biol. 2013;117:391-410.

Bischoff M, Gradilla AC, Seijo I, Andrés G, Rodríguez-Navas C, González-Méndez L, Guerrero I. Cytosomes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. Nat Cell Biol. 2013 Nov;15(11):1269-81.

Gradilla AC, González E, Seijo I, Andrés G, Bischoff M, González-Méndez L, Sánchez V, Callejo A, Ibáñez C, Guerra M, Ortigão-Farias JR, Sutherland JD, González M, Barrio R, Falcón-Pérez JM, Guerrero I. Exosomes as Hedgehog carriers in cytoskeleton-mediated transport and secretion. Nat Commun. 2014 Dec 4; 5:5649.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

- Supervisión científico-técnica en el diseño experimental, análisis e interpretación de resultados.
- Formación y supervisión de los usuarios en el manejo del microscopio electrónico.
- Tinción negativa de complejos macromoleculares, nanopartículas y virus.
- Fijación química e inclusión convencional en resina de especímenes biológicos.
- Criofijación, criosustitución e inclusión en resina a baja temperatura.
- Ultramicrotomía de muestras infiltradas en resina.
- Crioultramicrotomía (técnica de Tokuyasu).
- Inmunomicroscopía electrónica con conjugados a oro coloidal.
- Microscopía correlativa óptica-electrónica.
- Criofractura, criosecado y obtención de réplicas Pt/C.
- Microscopía electrónica de ácidos nucleicos.

Description

The electron microscopy facility (EMF) 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. The EMF instrumentation includes a 100 kV transmission electron microscope equipped with a 4k digital camera, an inverted fluorescence microscope devoted to CLEM techniques and the following instruments for sample processing: a plunge-freezing unit, an automatic freeze-substitution system, a conventional ultramicrotome, a cryoultramicrotome and a freeze-etching unit. During the 2013-2014 period, the EMF has been used by more than 35 research groups from CBMSO and 30 groups from other institutions. Also, the EMF has contributed to 25 publications, participating as authors in the following ones:

SERVICES

- Technical and scientific supervision on experimental design and data analysis.
- Training and supervision of EM facility users.
- Negative staining of macromolecular complexes, nanoparticles and viruses.
- Chemical fixation and resin-embedding of biological specimens.
- Cryofixation, freeze-substitution and low temperature embedding.
- Ultramicrotomy of resin embedded samples.
- Tokuyasu's cryosectioning.
- Immunoelectron microscopy with gold conjugates.
- Correlative light-electron microscopy.
- Freeze-fracture, freeze-etching and Pt-C replication.
- Electron microscopy of nucleic acids.

SERVICIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y CONFOCAL (SMOC)

OPTICAL AND CONFOCAL MICROSCOPY CORE FACILITY (SMOC)



Director Técnico /
Technical Director:
Dr. Carlos Sánchez Martín

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. Javier Díez Guerra

Personal / Personnel:
María Ángeles Muñoz Alcalá
Teresa Villalba Villacorta
Verónica Labrador Cantarero
Ricardo Madrid González
Carmen Sánchez Jiménez

Página Web / Web page:
<http://www.cbm.uam.es/confocal>

Descripción

El SMOC fue creado en el año 1999. Actualmente tenemos 6 sistemas confocales, 3 de ellos con adquisición espectral, un sistema Multifotón, 6 microscopios de campo ancho, una lupa y un vibrátomo. En 2 de los confocales y en 3 de los microscopios de campo ancho se dispone de cámaras de incubación y sistemas de perfusión para experimentos in vivo de larga duración. También distribuimos anticuerpos, marcadores fluorescentes, medios de montaje, soportes de plástico y vidrio para montaje y cultivo de las muestras y otros accesorios y reactivos con aplicaciones en la microscopía óptica.

- Estamos certificados con la norma ISO9001:2008 desde el año 2009.

Description

The SMOC facility was created in 1999. Nowadays, we have six confocal systems, three of them with spectral acquisition, one Multiphoton system, six widefield microscopes, one stereomicroscope and one vibratome. Two of the confocal systems and three of the widefield microscopes have incubation chambers and perfusion systems for long-term in vivo experiments. Additionally, we distribute some antibodies, fluorescent markers, mounting media, glassware and dishes typically used for microscopy applications.

We are ISO9001:2008 Quality Standard Norm certified from 2009.

Articles:

"Setting Up and Running an Advanced Light Microscopy and Imaging Facility". C. Sánchez, M.A. Muñoz, M. Villalba, V. Labrador and F.J. Díez-Guerra, 2010. *Current Protocols in Cytometry*. 57:12.22.1-12.22.21.

Advanced Optical Microscopy Techniques for the study of cellular physiopathology. F.J. Díez Guerra y C. Sánchez. Chapter 5, Section II (Papel de la Biología Molecular y Celular en el estudio de las Enfermedades Renales) (4th Edition. 2013). *Nefrología Clínica*. Ed.: L. Hernando Avendaño. Ed. Médica Panamericana.

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 en la organización y soporte de la Red Española de Microscopía Óptica Avanzada (REMOA) (<http://remoa.net>) desde su fundación en el año 2011. Hemos organizado, junto al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), el 2º Congreso de REMOA en Madrid, 13-15 de Octubre de 2014.
8. Soporte y organización de la Plataforma de Microscopía para Biociencias de la Comunidad de Madrid desde 2013 (<http://www.madrimasd.org/Laboratorios/plataformas-red/ficha.asp?IdPreli=3>), formando parte de la Red de Laboratorios de la Comunidad Autónoma de Madrid con el número 216 desde el año 2006.

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. Support and organization of the Spanish Network of Advanced Optical Microscopy (REMOA) (<http://remoa.net>) from its foundation, in 2011. We have just organized, together with Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), the 2nd Congress of the Spanish Advanced Optical Microscopy Network (REMOA) in Madrid, October 13-15th 2014.
8. Support and organization of the Microscopy Platform for Biosciences from 2013 (<http://www.madrimasd.org/Laboratorios/plataformas-red/ficha.asp?IdPreli=3>), as part of the Laboratory Network of Comunidad Autónoma de Madrid with the number 216 from 2006.

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
 Dra. María Fernández Lobato

Personal / *Personnel:*
 Dr. Carlos García García
 Dra. Esperanza Morato López
 Dra. Mercedes del Valle Sanz
 Laura Peláez Aguado

Página Web / *Web page:*
www.cbm.uam.es/servicios/proteomica.htm
 y www.proteored.org



Descripción

Desde 1993 la trayectoria del Servicio de Proteómica del CBMSO ha sido paralela a la evolución de la comunidad científica en el estudio de las proteínas y sus objetivos son ofrecer apoyo y asesoramiento al investigador con métodos apropiados para preparar la muestra y diseñando el flujo de trabajo óptimo para cada objetivo. El laboratorio está equipado con sistemas de electroforesis 1D y 2D y tres espectrómetros de masas, un MALDI-TOF (Bruker), un LTQ-VELOS (2D-Trampa iónica en tándem-Thermo-Scientific) y un LTQ-ORBITRAP-VELOS-PRO (2D-Trampa iónica en tándem acoplada a un analizador Orbitrap-Thermo-Scientific). Nuestro Servicio ha sido usado por numerosos proyectos de investigación en toda España.

Formación:

- * Cursos en Proteómica avanzada para el personal del Servicio.
- * Seminarios dirigidos a usuarios acerca de los avances recientes en instrumentación.
- * Participación en congresos de Proteómica nacionales e internacionales.

Description

In 1993 the Protein Chemistry Facility was created in the CBMSO. The trajectory of the Proteomics Facility has ever since paralleled 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 sample preparation and design of the appropriate work-flow for each objective. The laboratory is equipped with systems to run 1-D and 2-D electrophoresis and three mass spectrometers: a MALDI-TOF from Bruker, a LTQ-VELOS (2D-Ion Trap in tandem) from Thermo-Scientific and a 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 meetings on proteomics.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

Electroforesis SDS-PAGE
 Tinción de geles
 Análisis de peso molecular de péptidos y proteínas mediante MALDI-TOF
 Preparación de muestras (precipitación, digestión, desalado)
 Identificación de proteínas mediante mapeo peptídico (PMF)
 Identificación de proteínas mediante LC-MS/MS (ESI-LTQ-VELOS/ORBITRAP)
 Caracterización de proteínas y proteomas (análisis de modificaciones postraduccionales)
 Secuenciación De novo

SERVICES

SDS-PAGE electrophoresis
 Gel staining
 Protein and peptide molecular weight analysis by MALDI-TOF
 Sample preparation (precipitation, digestion, desalting)
 Protein identification by peptide mass fingerprinting (PMF)
 Protein Identification by LC-MS/MS (ESI-LTQ-VELOS/ORBITRAP)
 Protein and proteome characterization (analysis of post-translational modifications)
 De novo sequencing

SERVICIO DE TRANSGÉNESIS

TRANSGENESIS FACILITY



Supervisor científico y director técnico /
Scientific supervisor and Technical Director:
Dra. M^a Belén Pintado Sanjuanbenito CNB

Personal / Personnel:
Verónica Domínguez Plaza (Tecnología células ES) CBMSO
Alfredo Serrano Montalbo (Microinyección) CNB
Marta García Flores (Biología Molecular) CNB

Descripción

La unidad de transgénesis CNB-CBMSO, es un servicio científico conjunto de los centros CBMSO y CNB creada con el objetivo de dar apoyo a los grupos de investigación en la creación, establecimiento e intercambio de modelos murinos genéticamente modificados. La unidad asesora sobre la mejor estrategia para obtener el modelo de ratón en todos sus pasos: la creación del modelo y el establecimiento de la línea para obtener el genotipo deseado. La unidad proporciona todos los recursos necesarios tanto de animales como de tecnología, incluyendo transgénesis aditiva, mutagénesis dirigida (KO y KI) o edición génica (ZFNs, TALENs o CRISPRs). La unidad cuenta con 3 plataformas de microinyección, dotadas con microinyectores y piezo taladro, estereomicroscopios, microforja y estirador de pipetas. Además cuenta con un laboratorio estándar de biología molecular y un laboratorio de cultivos celulares específico para células ES. El servicio tiene acceso pleno a los animalarios del CBMSO y CNB.

Description

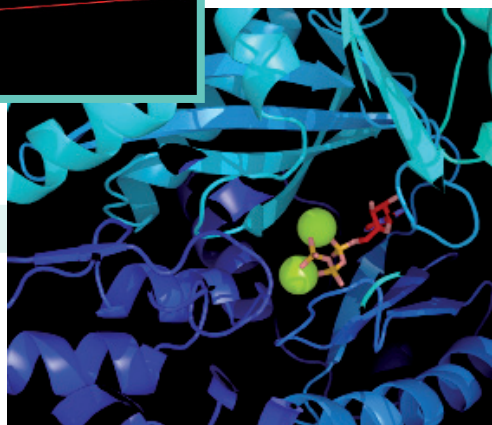
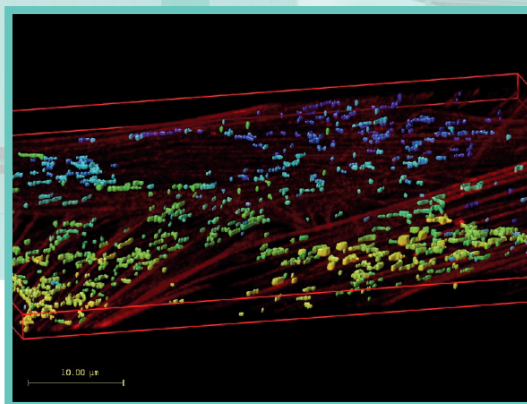
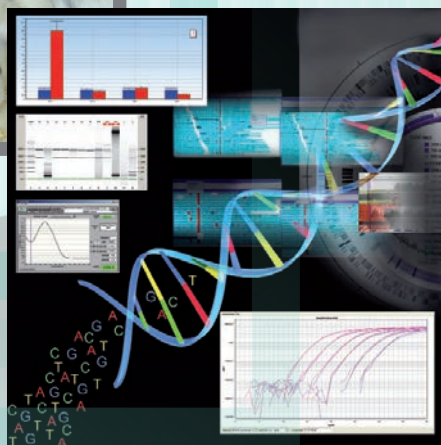
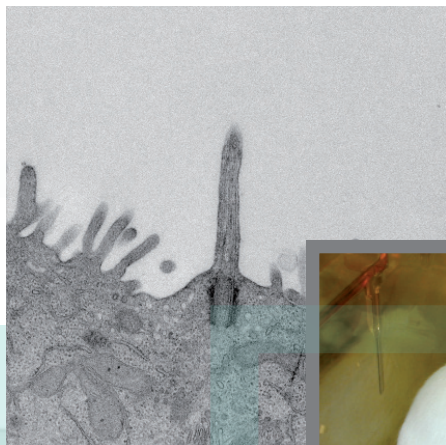
The CNB-CBMSO Transgenesis Unit is a joint scientific service shared between both centers, CBMSO and CNB with the aim to provide support to researchers in the creation, establishment and interchange of genetically modified mouse models. The Unit offers technical and scientific support on the best strategy to obtain the desired mouse model in all the required steps: creation of a genetically modified model, establishment and management of lines in order to achieve the desired genotype. We provide the necessary animal resources and technology either by additive transgenesis, targeted mutagenesis (KO, KI) or Genome editing (ZFNs, TALENs and CRISPRs). The service counts with three microinjection settings including microinjectors and piezo drill, dissecting microscopes, microforge and pipette puller plus a standard molecular biology laboratory and a fully equipped laboratory for ES cells handling. The unit has access to the animal facilities of CBMSO and CNB.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

Asesoría en el diseño de vectores de mutación dirigida y transgenes.
Microinyección pronuclear de DNA plasmídico, BACs y YACs
Electroporación de líneas celulares ES.
Edición genómica mediada por inyección de ZFNs, TALENs y CRISPR/Cas.
Manipulación e inyección de células ES procedentes de consorcios internacionales para generación de quimeras.
Generación de células ES de ratón.
Purificación de DNA para microinyección e identificación de fundadores por PCR.
Rederivación sanitaria de líneas de ratón procedentes de centros externos mediante FIV o transferencia de embriones.
Técnicas de reproducción asistida para solucionar problemas de la gestión de ratones modificados genéticamente.
Apoyo en el establecimiento y gestión de líneas genéticamente modificadas.
Formación específica en la obtención, manejo y cultivo de embriones de ratón en fases previas a la implantación.

SERVICES

Advise in the design of target vectors or constructs for microinjection.
Pronuclear microinjection of plasmidic, BAC and YAC DNA.
Vector electroporation into ES cell lines
Genome editing through ZFN, TALENs and CRISPR/ Cas9 injections.
International consortia ES cells handling and injection to generate chimeras.
Derivation of murine ES cell lines.
DNA purification and founder identification by PCR upon request.
Embryo rederivation through IVF or embryo transfer from external animal facilities.
Reproductive biotechnology to solve breeding problems of genetically modified mice.
Support in the establishment and management of genetically altered mouse lines.
Specific training in collection, handling and culture of mouse embryos in preimplantational stages.

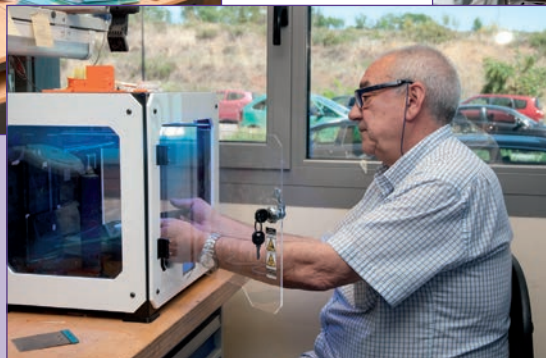


ADMINISTRACIÓN*Administration***BIBLIOTECA***Library***COMPRAS Y ALMACÉN***Purchase Department***CULTIVOS, LAVADO Y ESTERILIZACIÓN***Cell Culture, Washing and Sterilization***DIRECCIÓN***Management Board***DISEÑO GRÁFICO***Graphic Design***FOTOGRAFÍA***Photography***GESTIÓN DE PERSONAL***Personnel Management***GERENCIA***Management***INFORMÁTICA***Computing***INSTRUMENTACIÓN***Instruments and Equipment***MANTENIMIENTO***Maintenance***RECEPCIÓN***Reception***RELACIONES INSTITUCIONALES***Institutional Relations***SEGURIDAD BIOLÓGICA***Biological Security***PREVENCIÓN Y SALUD LABORAL***Safety and Occupational Risk**Prevention*

SERVICIOS GENERALES



General Services



ADMINISTRACIÓN**ADMINISTRATION**

Jaime García Martín-Delgado
Carmen Arroyo Martín
Montserrat Barbero Maturana
Josefina Escribano Molina
Mercedes Herrador Morales
(Hasta 1/4/2013)
Jesús Alfonso Maíz Delgado
Jessica Martínez Santos
Pilar Nogal París
Miguel Pérez Pulido
Sonia Rubio Lago
Silvia Villalba García
Belén Villar Pérez

BIBLIOTECA**LIBRARY**

Rosario Gutiérrez García
Ana García Herranz
Dunia Mairena Escribano

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
(Hasta 6/2014)
Jesús Miguel Hernández Lago
Joaquín Parra García
Teodoro Pedraza Caro

**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
Irene Bustos Sánchez
Juana Bustos Sánchez
(Hasta 6/2014)
María Cazorla Plaza
Antonia Cerrato Gómez
Anunciación Gaceo Esteban
Miriam García Carrascal
M^a Nieves Martín Bermejo
F. Borja Mirasol Burgos
Gema Mondéjar Navas
Ana M^a Pérez Colmenar
Juan Antonio Rebelles Vicente
Antonio Tirado Morón

DIRECCIÓN**MANAGEMENT BOARD**

Antonia Condes Cano

DISEÑO GRÁFICO**GRAPHIC DESIGN**

José Ignacio Belio López

FOTOGRAFÍA**PHOTOGRAPHY**

José Antonio Pérez Gracia

GESTIÓN DE PERSONAL**PERSONNEL MANAGEMENT**

M^a Reyes Llaguno Pérez
Montserrat Cantarero García
(Hasta 7/2014)
Remedios Madrid del Álamo
Isabel de la Rosa Santos
Pedro Alejandro Pérez García

GERENCIA**MANAGEMENT**

Germán Lerma Rodrigo
Gloria Escribano Sánchez

INFORMÁTICA**COMPUTING**

Pedro Pemau Alonso
Luis Antón Pérez
Diego Díaz Rodilla
Ángel J. Gonzalo Gonzalo
Jorge César Montoya Valero
(Hasta 12/2013)
María Peña Pérez García
Santiago Soto-Largo Dimitrieff
(Hasta 4/2013)

INSTRUMENTACIÓN**INSTRUMENTS AND EQUIPMENT**

Francisco Gutiérrez de la Cruz
Santiago Arenas Martínez
(Hasta 5/2013)
Juan A. Delgado Rodríguez
Jesús González Galán
José Luis Mejías Pozuelo
Fernando Muñoz Maqueda
Jesús Pozuelo Torrijos
(Hasta 2/2014)

MANTENIMIENTO**MAINTENANCE**

José Antonio Muñoz Díez
José Andrés Hernández
Pedro Pablo Cordón Polanco
Juan Luis García Alarcón
Dominic López Irving
César Martos Valladares
Emilio Montero Mínguez
Carlos Quiñones de la Guía
José María Sanz Mejías

RECEPCIÓN**RECEPTION**

Manuel Barajas Marín
(Hasta 11/2014)
M^a Jesús Gil Marinas

RELACIONES INSTITUCIONALES**INSTITUTIONAL RELATIONS**

Mercedes Huete Pereda
Jessamyn Jackson
(Hasta 7/2014)

SEGURIDAD BIOLÓGICA**BIOLOGICAL SECURITY**

Angeles Sánchez Sánchez
Gema Caparrós de la Jara
M^a Cruz Valladares Bartolomé

PREVENCIÓN Y SALUD**LABORAL****SAFETY AND OCCUPATIONAL
RISK PREVENTION**

M^a Carmen López Vara
Antonio Sánchez Moreno
(Hasta 6/2014)

- 192 Lecciones Conmemorativas
Memorial Lectures
- 193 Ciclo de Seminarios “Severo Ochoa”
Cycle “Severo Ochoa” Seminars
- 194 Seminarios AD-HOC
AD-HOC Seminars
Seminarios de Centro
Regular Seminars
- 195 Seminarios Special
Special Seminars



SEMINARIOS Y LECCIONES CONMEMORATIVAS
SEMINARS AND MEMORIAL LECTURES

SEMINARIOS Y LECCIONES

AULA RAMÓN ARECES



Seminars and Lectures

LECCIONES CONMEMORATIVAS / MEMORIAL LECTURES



XIV Lección Conmemorativa Eladio Viñuela 2013

XIV Eladio Viñuela Memorial Lecture 2013

20/03/013

Eckard Wimmer

Stony Brook University School of Medicine
Stony Brook, NY, USA

"Recoding of Viral Genomes through Chemical Synthesis:
New Genetics and New Vaccine Candidates"

XV Lección Conmemorativa Eladio Viñuela 2014

XV Eladio Viñuela Memorial Lecture 2014

26/03/014

Carlos López-Otín

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Oviedo

"Cáncer y envejecimiento: paisajes genómicos
y análisis funcionales"



XX Lección Conmemorativa Severo Ochoa 2013

XX Severo Ochoa Memorial Lecture 2013

22/11/013

Elaine Fuchs

Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University,
New York, USA Stony Brook, NY, USA

"Stem Cells in Silence, Action and Cancer"

XXI Lección Conmemorativa Severo Ochoa 2014

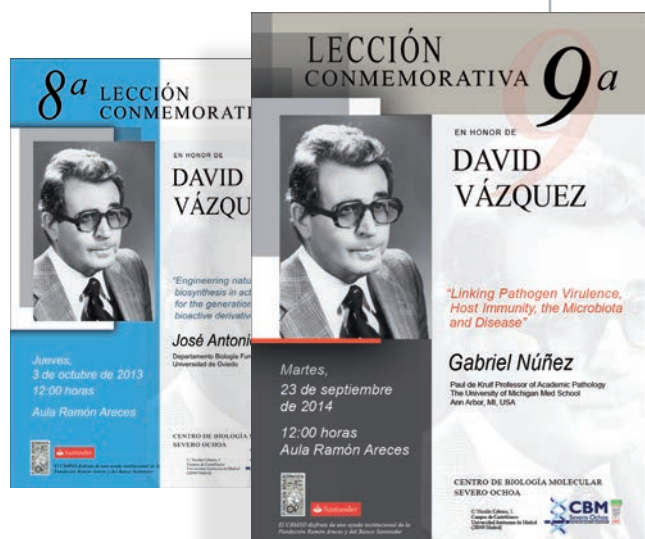
XXI Severo Ochoa Memorial Lecture 2014

3/11/014

Pietro de Camilli

Yale University School of Medicine. New Haven, CT, USA

"Lipid Signaling in the Control of Membrane Dynamics
and Interactions"



VIII Lección Conmemorativa David Vázquez 2013

VIII David Vázquez Memorial Lecture 2013

3/10/013

José Antonio Salas

Departamento Biología Funcional, Universidad de Oviedo

"Engineering natural product biosynthesis in actinomycetes for
the generation of novel bioactive derivatives"

IX Lección Conmemorativa David Vázquez 2014

IX David Vázquez Memorial Lecture 2014

23/09/014

Gabriel Núñez

Paul de Kruif Professor of Academic Pathology, The University of
Michigan Med School, Ann Arbor, MI, USA

"Linking Pathogen Virulence, Host Immunity, the Microbiota
and Disease"

14º y 15º Ciclo Seminarios Severo Ochoa "Avances en Biología Molecular" 2013/2014

CBMSO 2013-2014

14º and 15º Severo Ochoa Cycle
"Advances in Molecular Biology" 2013/2014



FECHA / DATE	SEMINARISTA / SPEAKER	CENTRO / CENTER	TÍTULO DEL SEMINARIO / TITLE OF SEMINAR
14º CICLO			
15/02/2013	Marcos González Gaitán	Department of Biochemistry University of Geneva, Switzerland	Dynamics of Dpp signaling and growth control
22/02/2013	James Sharpe	Systems Biology Research Unit Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona, Spain	What about the horse part? Modelling pattern formation during limb development
15/03/2013	Javier Cáceres	MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, Scotland, UK	Regulation of microRNA biogenesis and function
22/03/2013	Erik Sahai	Cancer Research UK, London Research Institute, 44 Lincoln's Inn Fields. London, UK	Cancer Cell Invasion in Complex environments"
05/04/2013	Yves Brun	Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana, USA	Evolution and regulation of bacterial growth, morphology, and development
10/05/2013	Bart de Strooper	Center for Human Genetics, Flanders Institute for Biotechnology (VIB), KULeuven, Belgium	The biology and pathology of intramembrane cleaving gamma-secretases and opportunities for drug development in Alzheimer Disease
17/05/2013	Ben Berkhout	Department of Medical Microbiology Academic Medical Center, Amsterdam, Netherlands	Recent advances in fundamental and applied HIV-1 research
15º CICLO			
29 /11/2013	Harvey McMahon	Neurobiology Division. MRC Laboratory Molecular Biology Cambridge, UK	A Fast clathrin-independent endocytic mechanism
13/12/2013	Marian Ros	IBBTEC- Facultad de Medicina, Universidad Cantabria, Santander	Papel de los factores de transcripción Sp6 y Sp8 en el desarrollo de las extremidades
24/01/2014	Urs Greber	Cell Biology - Greber Lab, Institute of Molecular Life Science, University of Zürich, Switzerland	How Viruses Navigate in Cells - from Entry to Egress
07/02/2014	Philip Eaton	The Rayne Institute, St. Thomas' Hospital London, UK	Thiol redox sensors in the cardiovascular system
14/03/2014	Freddy Radtke	Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC) Laussane, Switzerland	Notch Signaling in Self-renewing Tissues and Cancer
04/04/2014	Andrei N. Lupas	Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen, Alemania	The origin of folded proteins
09/05/2014	Luis Serrano	Centro de Regulación Genómica (CRG) Barcelona	Protein competition could be involved in determining cell signaling specificity: The Erb-MAPK as an example
20/05/2014	Giacomo Cavalli	Institute of Human Genetics Montpellier, France	Epigenetics of chromosome folding and evolution
13/06/2014	Inbal Goshen	Hebrew University of Jerusalem Jerusalem, Israel	Illuminating memory: an optogenetic approach to study the role of neurons and glia in memory acquisition and recall
26/09/2014	Steve Wilson	Department of Cell and Developmental Biology UCL, London, UK	Breaking symmetry in the brain: from genes to circuits

Seminarios AD-HOC 2013

AD-HOC Seminars 2013



FECHA / DATE	SEMINARISTA / SPEAKER	CENTRO / CENTER	TÍTULO DEL SEMINARIO / TITLE OF SEMINAR
08/02/2013	Esteban Veiga	Centro Nacional de Biotecnología, Madrid	Bacterial Transfer to T Cells through the Immunological Synapse
26/02/2013	Anna Aragay	Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB), CSIC	A new role of Gq protein in mitochondrial fission and fusion
14/03/2013	César Muñoz Fontela	Heinrich Pette Institute - Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburgo, Germany	Mechanisms of peripheral immunity to emerging viruses
15/03/2013	Francisco J. Tejedor	Instituto de Neurociencias CSIC-UMH Universidad Miguel Hernandez-Campus de San Juan (Alicante)	MNB/Dyrk1A: from <i>Drosophila</i> Optic Lobe Development to Down Syndrome
13/05/2013	Ulf Rädler	(ibidi, Germany)	New insights in cell based assays
20/05/2013	Sloan Siegrist Palmore	University of California Berkeley	Tear Down this Wall! Peptidoglycan Dynamics of Intracellular Pathogens
30/05/2013	José Pastor Pareja	School of Life Sciences, Tsinghua University, Pekin	Tissue biology and basement membranes
07/06/2013	Diego Miranda-Saavedra	WPI Immunology Frontier Research Centre (IFReC), Osaka University, Japan	A systems biology approach to dissect and manipulate the anti-inflammatory response

Seminarios de Centro 2013-2014

Regular Seminars 2013-2014



08/07/2013	Jaime Castelli-Gair	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC/JA/UPO), Sevilla	An extreme case of divergent evolution at the origin of insect respiratory and endocrine organs
23/09/2013	Dominique Muller	Neuroscience Center, University of Geneva, Switzerland	Structural plasticity of hippocampal excitatory and inhibitory networks
09/12/2013	Angel Raya	ICREA Barcelona	Biomedical applications of induced pluripotent stem (iPS) cells
28/02/2014	Yohannes Bellaiche	Institut Curie, France	Epithelial cell dynamics during tissue morphogenesis
25/04/2014	Michael Heneka	Bonn University, Germany	Does innate immunity contribute to Alzheimer's disease?
08/05/2014	Stefano Piccolo	Institute of Histology and Embriology, Padova University	The Hippo pathway: organ size control and tumorigenesis
12/09/2014	Benedicte Sanson	Universidad de Cambridge	<i>In vivo</i> mechanisms of collective cell movement and compartmental cell sorting
11/10/2014	Paul Lehner	Cambridge Institute for Medical Research University of Cambridge School of Clinical Medicine, UK	Novel genetic and proteomic approaches to viral evasion

Seminarios Special 2013-2014

Special Seminars 2013-2014



FECHA / DATE	SEMINARISTA / SPEAKER	CENTRO / CENTER	TÍTULO DEL SEMINARIO / TITLE OF SEMINAR
13/06/2013	Kenneth Stedman	Center for Life in Extreme Environments, Portland State University, Oregon, USA, and Virus Focus Group, NASA Astrobiology Institute	Viruses from Hell
13/06/2013	Tung-Tien Sun	Department of Cell Biology, New York University Medical School, New York, USA	Membrane specialization during bladder orothelial differentiation
18/06/2013	Philippe Sansonetti	Institut Pasteur and Collège de France, Paris, France	Commensal and pathogenic bacteria: War and Peace at mucosal surfaces
02/07/2013	James B. Hurley	Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, WA, USA	Pools, circuits and metabolic networks in the retina
12/09/2013	Lorenzo Lamattina	Universidad Nacional de Mar del Plata/CO-NICET, Mar del Plata, Argentina	Ahora sí, por fin, se ha encontrado una óxido nítrico sintasa (NOS) en el reino de las plantas
20/09/2013	Nonia Pariente	Senior Editor, EMBO Reports	EMBO publications: a look behind the scenes
24/09/2013	Erika Pastrana	Senior Editor, Nature Methods	Tips for successful publishing in the Nature titles
01/10/2013	H. Uri Saragovi	Lady Davis Institute, Jewish General Hospital - McGill University, Montreal, Quebec, Canada	<i>Cancer vaccines targeting glycolipid tumor markers elicit therapeutic humoral and cellular immunity</i>
02/10/2013	Julián G. Cambrero	Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wright State University School of Medicine, Ohio, USA	Cell migration and tumorigenesis mediated by phospholipase D
04/10/2013	Andrés Barria	Department of Physiology and Biophysics, University of Washington, Seattle, WA, USA	Trafficking, function and regulation of NMDA-type glutamate receptors
04/10/2013	François Noël	Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil	Pharmacological evaluation of N-phenylpiperazine derivatives designed as atypical antipsychotic drug candidates
07/11/2013	Robert Balaban	Laboratory of Cardiac Energetics, National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD, USA	The systems biology of the mitochondrion

Seminarios Special 2013-2014

Special Seminars 2013-2014



FECHA / DATE	SEMINARISTA / SPEAKER	CENTRO / CENTER	TÍTULO DEL SEMINARIO / TITLE OF SEMINAR
08/11/2013	Tomás Aragón Amorriz	Centro Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona, España	The non-conventional recruitment of XBP1 mRNA to endoplasmic reticulum signaling centers
12/11/2013	José María Mato	CIC-bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia	El hígado graso: como se inicia y a que puede dar lugar
19/11/2013	Elisa Martí	Instituto de Biología Molecular de Barcelona-CSIC	Neural Stem cells, understanding the in vivo regulation of cell fate determination
27/11/2013	Lieven De Veylder	VIB Department of Plant Systems Biology, Ghent University, Belgium	Quiescent stem cells: not so quiescent after all
05/02/2014	Manuel Perucho	Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, California, USA	Genetics and epigenetics of colon cancer
28/02/2014	Yohanns Bellaiche	Institut Curie, Paris, France	Epithelial cell dynamics during tissue morphogenesis
17/03/2014	Ana Rojas	Computational Biology and Bioinformatics Group (CbBio), Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS-HUVR)	Emergence of the DNA Damage Response: implications for downstream analyses
19/03/2014	Margarida Correia Neves	Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal	How the thymus copes with mycobacterium infection
28/03/2014	Antonio Gómez	External Collaborations, Janssen Research and Development	Open Innovation de Johnson & Johnson: Posibilidades de Colaboración
11/04/2014	Luis María Escudero	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Sevilla	Tissue Packing Explained by Simple Mathematical Principles
16/09/2014	Sergio Lavandero	Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas. Universidad de Chile	Mecanismos transduccionales de insulina e IGF-1 en corazón
19/09/2014	Keith Mostov	University of California School of Medicine Genentech Hall San Francisco, CA, USA	A molecular switch for forming an epithelial tissue
06/10/2014	Jeroen Hoozemans	Department of Pathology, VU University Medical Center, Neuroscience Campus Amsterdam, The Netherlands	Activation of the Unfolded Protein Response in Alzheimer's disease and related disorders
10/10/2014	Hal Dietz	Dep. Pediatrics, Medicine, and Molecular Biology & Genetics Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA	Found in Translation: New Insights into the Pathogenesis and Treatment of Marfan Syndrome and Related Disorders
27/10/2014	Rodrigo Bermejor	Instituto de Biología Funcional y Genómica de Salamanca	Mechanisms of replication fork monitoring and protection
18/11/2014	Florentino Borondo	Instituto de Ciencias Matemáticas (ICMAT)	Redes complejas: una herramienta matemática para la ciencia del siglo XXI
20/11/2014	Natalia Sánchez-Soriano	Cellular and Molecular Physiology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, UK	Tau and Spectraplakins cooperate in synapse formation and neuronal longevity
25/11/2014	Dann Westenbrink	University Medical Center de Groeningen	Mitochondrial reprogramming in heart failure
26/11/2014	Javier Morante	Instituto de Neurociencias de Alicante. Universidad Miguel Hernández – CSIC. Alicante	From neural stem cells to neural circuits
27/11/2014	Juan Pié Juste	Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza	Síndrome Cornelia de Lange: Una enfermedad comp
16/12/2014	Giles Hardingham	The University of Edinburgh	Transcriptional control protective and degenerative pathways in neurons



MEMORIA CIENTÍFICA CBMSO 2013-2014
Scientific Report 2013-2014

Coordinadores / Coordinators

Cecilio Giménez Martín y César de Haro Castella

Diseño, maquetación y fotografías / *Graphic design and photograpies*

Servicios de Diseño Gráfico y Fotografía del CBMSO /
Graphic Design and Photography Services of CBMSO

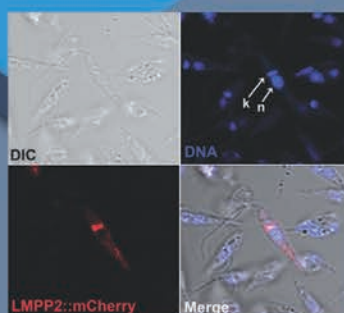
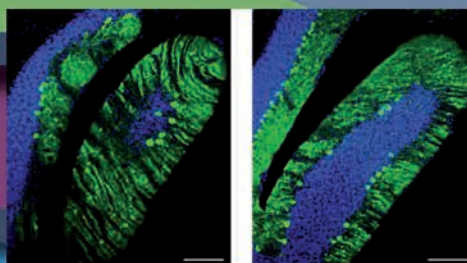
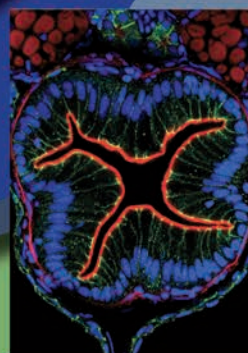
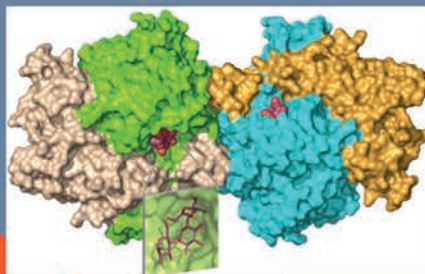
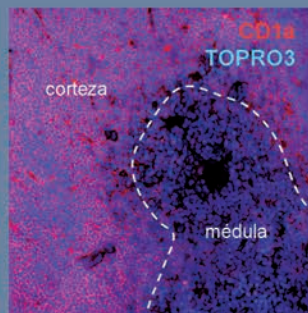
(José I. Belio López y José A. Pérez Gracia)

Impresión / *Printed by*

Gramadosa, S.L.

Depósito Legal: M-21439-2015

BIOLOGÍA CELULAR E INMUNOLOGÍA / CELL BIOLOGY AND IMMUNOLOGY
 VIROLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA / VIROLOGY AND MICROBIOLOGY
 DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN / DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION
 NEUROBIOLOGÍA MOLECULAR / MOLECULAR NEUROBIOLOGY
 DINÁMICA Y FUNCIÓN DEL GENOMA / GENOME DYNAMICS AND FUNCTION



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

